



#1/2

DOCKET NO. 7063-001-0

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF : :

Renata Maria Anna CAVALIERE VESELY ET AL: GROUP ART UNIT:

SERIAL NUMBER: NEW U.S. APPLICATION : EXAMINER:

FILED: HEREWITH : :

FOR: STRAINS OF BACTERIA AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION  
CONTAINING ONE OR MORE OF SUCH STRAINS AND USE OF SAME FOR  
PREVENTING AND TREATING DISEASES ASSOCIATED WITH OR CAUSED BY  
ALTERED METABOLISM OF BILE ACIDS : :

REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119  
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

Sir:

In the matter of the above-identified application for  
patent, notice is hereby given that the applicants claim as  
priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO.</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
ITALY	MI 96 A 000468	MARCH 11, 1996

A Certified copy of the corresponding Convention  
Application(s) is(are) being submitted herewith.

Respectfully submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,  
MAIER & NEUSTADT, P.C.

Norman F. Oblon  
Attorney of Record  
Registration No. 24,618

Fourth Floor  
1755 Jefferson Davis Highway  
Arlington, Virginia 22202  
(703) 413-3000  
Fax No. (703) 413-2220

Stephen G. Baxter, Ph.D.  
Registration No. 32,884

(OSMMN 4/95)

MODULARIO  
I.C.A. - 101

61581 U.S. TO  
08813776  
03/07/97

Mod. C.E. - 1-4-7



MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO  
DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI



Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per .....  
N. MT 96 A 000468

Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali  
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati  
risultano dall'accusato processo verbale di deposito

1.12.1997

Roma \_\_\_\_\_

IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE

## AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA E DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

UFFICIO CENTRALE BREVETTI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

## A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione Renata Maria Anna CAVALIERE ved. VESELY

Residenza MILANO

codice 01111111111111111111

N.G.

2) Denominazione Claudio DE SIMONE

Residenza ARDEA RM

codice 01111111111111111111

## B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.C.B.

cognome nome Ing. Martino SALVADORI

cod. fiscale

denominazione studio di appartenenza BUGNION S.p.A.

via Carlo Farini

n. B1

città MILANO

cap 00152

(prov) N

## C. DOMICILIO ELETTIVO DESTINATARIO

via \_\_\_\_\_ n. \_\_\_\_\_ città \_\_\_\_\_

cap \_\_\_\_\_

(prov) \_\_\_\_\_

## D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/scl) \_\_\_\_\_ gruppo/sottogruppo \_\_\_\_\_

CEPPI DI BATTERI, COMPOSIZIONE FARMACEUTICA, CONTENENTE UNO O PIÙ DI TALI CEPPI ED USO DEI MEDESIMI PER LA PREVENZIONE E LA TERAPIA DELLE MALATTIE ASSOCIAZIONI O PROVOCATE DA UN ALTERATO METABOLISMO DEGLI ACIDI BILIARI

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI  NO 

SE Istanza: DATA

N° PROTOCOLLO

## E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome Renata Maria Anna CAVALIERE ved. VESELY

cognome nome

1) Claudio DE SIMONE

3)

2) \_\_\_\_\_

4)

## F. PRIORITY

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R
1) _____	_____	_____	_____	_____
2) _____	_____	_____	_____	_____

## SCIOLIMENTO RISERVE

Data \_\_\_\_\_ N° Protocollo \_\_\_\_\_

## G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION

(ATCC) (USA) e COLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES (CNCM) (FRANCIA)

## H. ANNOTAZIONI SPECIALI

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

- Doc. 1)  PROV n. pag. 07 riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare) .....
- Doc. 2)  PROV n. tav. 01 disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare) .....
- Doc. 3)  RIS lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale .....
- Doc. 4)  RIS designazione inventore .....
- Doc. 5)  RIS documenti di priorità con traduzione in italiano .....
- Doc. 6)  RIS autorizzazione o atto di cessione .....
- Doc. 7)  nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale lire CINQUECENTOSESSANTACINQUERILA

obbligatorio

9) marche da bollo per attestato di brevetto di lire

obbligatorio

COMPILATO IL 11/03/1996

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE (I) per precura firma di Mandatario

CONTINUA SI/NO 

Ing. Martino SALVADORI

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO 

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI

Milano

codice

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA MI 96/A 000468

Reg.A

L'anno mille novemila novantasei, il giorno undici, del mese di marzo

il(i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 10 Gli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopriportato.

## I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE \_\_\_\_\_

timbro dell'Ufficio \_\_\_\_\_

L'UFFICIALE ROGANTE

CORTONI SI MAURIZIO

## RIASSUNTO INVENZIONE CON DISECRTO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

REG. B

DATA DI DEPOSITO

/ / / / / / / /

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

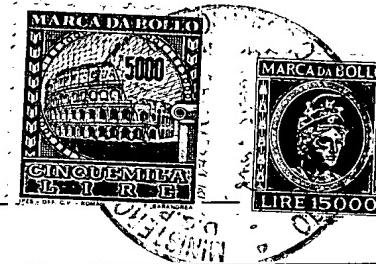
/ / / / / / / /

## D. TITOLO

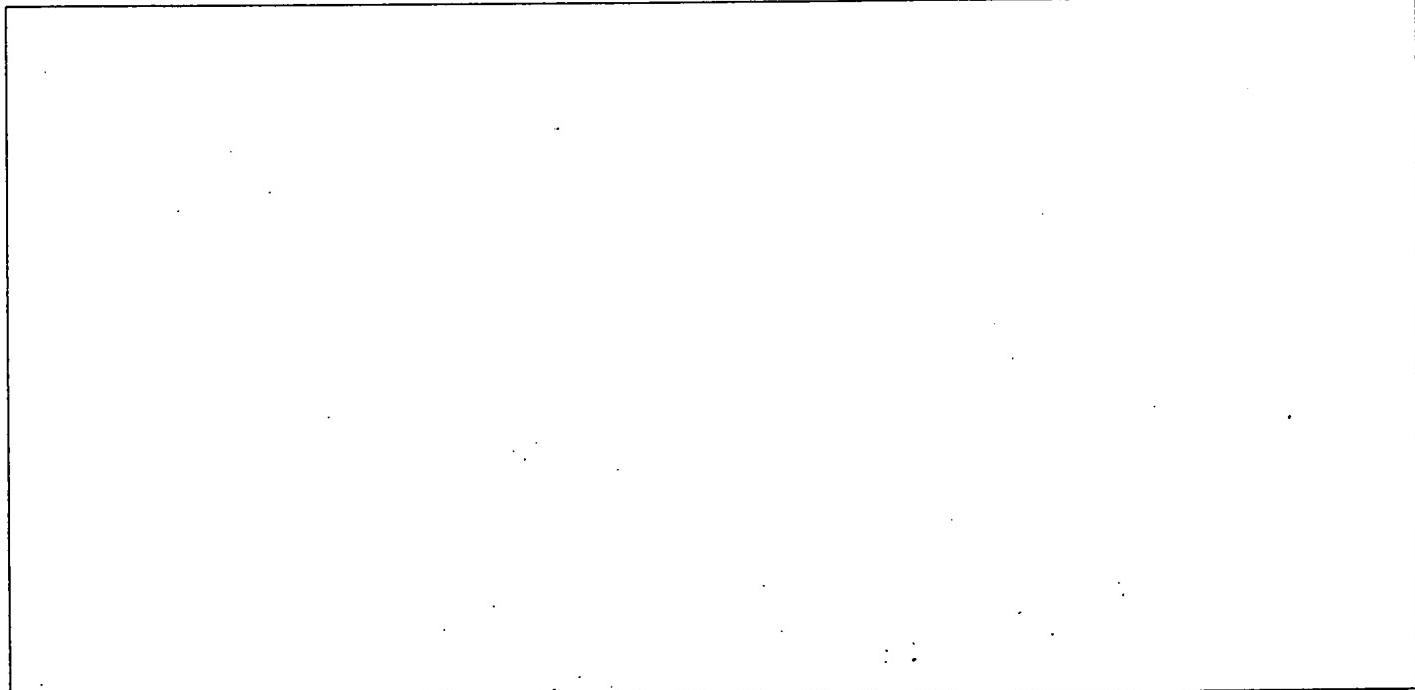
CEPPI DI BATTERI, COMPOSIZIONE FARMACEUTICA, CONTENENTE UNO O PIU' DI TALI CEPPI ED USO DEI MEDESIMI PER LA PREVENZIONE E LA TERAPIA DELLE MALATTIE ASSOCiate O PROVOCATE DA UN ALTERATO METABOLISMO DEGLI ACIDI BILIARI

## L. RIASSUNTO

Uso di ceppi di batteri caratterizzati dal presentare: (a) attività della 7α-deidrossilasi inferiore al 50% e, (b) attività di deconiugazione degli acidi biliari inferiore al 50%, e loro discendenti, mutanti e derivati che conservano le attività (a) e (b); composizione farmaceutica che usa uno o più di tali ceppi ed uso dei medesimi per la prevenzione e la terapia delle malattie associate o provocate da un alterato metabolismo degli acidi biliari.



## M. DISEGNO



## D E S C R I Z I O N E

annessa a domanda di brevetto per INVENZIONE  
INDUSTRIALE avente per titolo:

"CEPPI DI BATTERI, COMPOSIZIONE FARMACEUTICA,  
CONTENENTE UNO O PIU' DI TALI CEPPI ED USO DEI  
MEDESIMI PER LA PREVENZIONE E LA TERAPIA DELLE  
MALATTIE ASSOCiate O PROVOCATE DA UN ALTERATO  
METABOLISMO DEGLI ACIDI BILIARI".

Richiedente: 1) Renata Maria Anna CAVALIERE ved.  
VESELY, di nazionalità italiana  
residente a MILANO

2) Claudio DE SIMONE, di nazionalità  
italiana residente ad ARDEA

Mandatari : Ing. Giuseppe Righetti iscritto  
all'Albo con il n. 7, Ing. Carlo Raoul  
Ghioni iscritto all'Albo con il n. 280,  
Ing. Martino Salvadori iscritto  
all'Albo con il n. 438, Ing. Giuseppe  
Pirillo iscritto all'Albo con il n.  
518, Ing. Luca Sutto iscritto all'Albo  
con il n. 556, della BUGNION S.p.A. -  
Via Carlo Farini 81 - Milano.

Depositata il: al n.:

\* \* \* \* \*

DESCRIZIONE

La presente invenzione si riferisce a ceppi di batteri, composizione farmaceutica, contenente uno o più di tali ceppi ed uso dei medesimi per la prevenzione e la terapia delle malattie associate o provocate da un alterato metabolismo degli acidi biliari.

La bile epatica è un fluido isotonicco pigmentato con una composizione elettrolitica che assomiglia al plasma del sangue. La bile è costituita per la maggior parte da acqua (82%), acidi biliari (12%), lecitina ed altri fosfolipidi (4%), e colesterolo non esterificato (0,7%). Altri costituenti comprendono bilirubina coniugata, proteine, elettroliti, muco ed i prodotti della trasformazione epatica di farmaci, ormoni, ecc.

La produzione di bile da parte del fegato, in condizioni basali, è circa 500-1000 ml/giorno.

Gli acidi biliari primari, l'acido colico (CA) e l'acido chenodesossicolico (CDCA) sono sintetizzati dal colesterolo nel fegato, coniugati con glicina o taurina, e secreti nella bile. Gli acidi biliari secondari, comprendenti l'acido desossicolico (DCA) e l'acido litocolico (LA), sono formati nel colon come metaboliti batterici degli acidi biliari primari. Altri acidi biliari, chiamati acidi biliari

terziari (ad esempio l'acido ursodesossicolico - UDCA), sono formati nell'intestino a seguito dell'epimerizzazione enzimatica di gruppi -OH su anelli di sterolo da parte della flora intestinale. Nella bile normale, il rapporto dei coniugati di glicina rispetto ai coniugati di taurina è circa 2:1, mentre in pazienti con colestasi si trovano spesso concentrazioni aumentate di acidi biliari solfati e glicuronati. La microflora intestinale trasforma gli acidi biliari in diversi metaboliti. Queste biotrasformazioni comprendono l'idrolisi del legame tra l'acido biliare e taurina o glicina, con produzione di acidi biliari non coniugati o liberi e taurina o glicina. Gli acidi biliari non coniugati sono pertanto resi disponibili per l'ossidazione dei gruppi idrossilici alle posizioni C3, C7, e C12 e per la deidrossilazione alle posizioni 7 $\alpha$  e 7 $\beta$ . Quest'ultima trasformazione porta alla formazione degli acidi biliari secondari DCA e LA. Gli acidi biliari primari, deconiugati ma non trasformati, e gli acidi biliari secondari sono riassorbiti dal lumen dell'intestino ed entrano nel flusso sanguigno portale, quindi sono captati dagli epatociti, coniugati con glicina o taurina e ri-secreti nella bile (circolazione enteroepatica).

Normalmente, la massa degli acidi biliari circola approssimativamente da 5 a 10 volte al giorno. L'assorbimento intestinale della massa ha una resa del 95% circa, cosicché la perdita fecale degli acidi biliari è nel range di 0,3 a 0,6 g/giorno. La perdita fecale è compensata da una uguale sintesi giornaliera.

Per questo motivo la composizione della massa degli acidi biliari presenti nella bile è il risultato di complicate interazioni che si verificano fra il fegato e gli enzimi della microflora.

L'attività di deconiugazione è una caratteristica condivisa da molti batteri, aerobi ed anaerobi, ma è particolarmente comune fra i batteri anaerobi obbligati, cioè Bacteroides, Eubacteria, Clostridia, Bifidobacteria, ecc. La maggioranza dei batteri è attiva contro i coniugati sia di glicina sia di taurina; tuttavia, alcuni di questi hanno un certo grado di specificità, in funzione dell'amminoacido legato, e del numero di idrossidi legati al nucleo steroideo. Gli acidi biliari liberi ottenuti a seguito dell'azione di idrolasi batterica possono subire l'ossidazione dei gruppi idrossilici presenti alle posizioni C3, C7, e C12 per l'idrossisteroidodeidrogenasi.



L'interesse nei disordini metabolici degli acidi biliari deriva dall'ipotesi che gli acidi biliari e/o i loro metaboliti sono implicati nella patogenesi di alcune malattie epato-biliari e gastro-enterologiche: dispepsia biliare, colelitiasi, epatopatie acute e croniche, malattie infiammatorie del colon, etc..

In letteratura molto spesso l'idrofobicità dell'acido biliare è correlata alla capacità detergente; gli acidi biliari secondari sono più idrofobici dei primari, infatti il desossicolico (DCA) è più detergente del colico (CA). Pertanto un aumento della concentrazione di DCA nella bile può comportare:

- a) un aumento della secrezione di colesterolo con conseguente aumento dell'indice di saturazione,
- b) un effetto citotossico sugli epatociti.

Per questo una modifica qualitativa del pattern degli acidi biliari potrebbe essere determinante specialmente nel trattamento delle patologie prima menzionate.

Non sono stati trovati ceppi di batteri che possano modificare qualitativamente il pattern degli acidi biliari.

Così, rimane la necessità di trovare ceppi batterici

o composizioni efficaci che, riducendo sia l'attività della 7 $\alpha$ -deidrossilasi ed al contempo la deconjugazione, possano essere utilizzati per trattare e/o prevenire le malattie associate a disordini metabolici degli acidi biliari.

Uno scopo della presente invenzione è quello di usare ceppi di batteri caratterizzati dal presentare: (a) attività 7 $\alpha$ -deidrossilasi inferiore al 50%, e, (b) attività di deconjugazione degli acidi biliari inferiore al 50%, e loro discendenti mutanti e derivati che conservano le attività (a) e (b); composizione farmaceutica che usa uno o più di tali ceppi ed uso dei medesimi per la prevenzione e la terapia delle malattie correlate o provocate da un alterato metabolismo degli acidi biliari.

Questi ed altri scopi, che risulteranno più chiari nella descrizione dettagliata che segue, sono stati conseguiti dagli inventori che hanno trovato che esistono dei ceppi di batteri che hanno una ridotta o assente attività della 7 $\alpha$ -deidrossilasi ed una ridotta o assente capacità di deconjugare gli acidi biliari. Ciò è in contrasto con la tecnica nota precedente. Pertanto, la presente invenzione prevede l'uso di tali ceppi per modificare il metabolismo degli acidi biliari in modo utile per prevenire o

curare le malattie causate o correlate ai disordini metabolici degli acidi biliari.

La presente invenzione prevede altresì una composizione farmaceutica per curare e/o prevenire i disordini metabolici degli acidi biliari somministrando ad un paziente che ne ha bisogno uno o più ceppi di batteri che hanno una attività della 7 $\alpha$ -deidrossilasi di meno del 50% ed una attività di deconjugazione degli acidi biliari coniugati di meno del 50%.

Nel contesto della presente invenzione, i disordini metabolici degli acidi biliari sono coinvolti nella patogenesi di malattie del fegato e dell'apparato digerente comprendenti la sindrome dell'ansa cieca, i calcoli biliari, la cirrosi, epatopatie croniche, epatopatie acute, la fibrosi cistica, la colestasi intraepatica, le malattie infiammatorie intestinali, le colonpatie, il malassorbimento. Le presenti composizioni farmaceutiche possono anche essere utilizzate per prevenire l'insorgere di calcoli biliari nelle donne durante la gravidanza o nei periodi successivi, ed in soggetti che sono sottoposti a programmi di perdita di peso o diete. L'attività della 7 $\alpha$ -deidrossilasi del ceppo di batteri dovrebbe essere meno del 50%. I valori

dell'attività della 7 $\alpha$ -deidrossilasi sono quelli ricavati dall'Esempio 1 che segue. In particolare, le 10 $^7$  cellule del ceppo in questione sono incubate a 37°C per 48 ore, in 15 ml del terreno culturale specifico addizionato con 2 mg/ml di acido glicocolico (GCA) o 2 mg/ml di acido taurocolico (TCA), e quindi viene misurata la quantità del prodotto 7 $\alpha$ -deidrossilato. Il valore percentuale per l'attività della 7 $\alpha$ -deidrossilasi viene calcolato dalla seguente formula:

$$\text{Attività della 7}\alpha\text{-deidrossilasi} = \frac{\text{massa di prodotto 7}\alpha\text{-deidrossilato}}{\text{massa di GCA o TCA all'inizio dell'incubazione}} \times 100$$

In base a quanto precedentemente esposto, il ceppo dei batteri da somministrare dovrebbe inoltre, anche, avere un'attività di deconiugazione degli acidi biliari coniugati di meno del 50%. La capacità di deconiugare l'acido biliare è determinata usando la stessa procedura di incubazione descritta per misurare l'attività della 7 $\alpha$ -deidrossilasi, seguita dalla misurazione della quantità di prodotto deconiugato formato. L'attività di deconiugazione viene calcolata usando la formula seguente:

$$\text{massa di GCA o TCA deconiugata dopo}$$



Attività di deconiugazione = 48 ore di incubazione X 100  
massa di GCA o TCA all'inizio  
dell'incubazione

I ceppi di batteri della presente invenzione possono essere somministrati per via enterica.

Preferibilmente, i ceppi di batteri della presente invenzione sono somministrati per via orale.

Sebbene possa essere somministrato un singolo ceppo di batteri, è anche possibile somministrare una miscela di due o più batteri secondo la presente invenzione.

Sebbene il dosaggio esatto di batteri da somministrare vari con la condizione e la taglia del paziente, la malattia esatta da trattare, e l'identità dei ceppi da somministrare, sono stati ottenuti buoni risultati somministrando da  $10^3$  a  $10^{13}$  cellule per grammo di preparato, preferibilmente da  $10^8$  a  $10^{12}$  per grammo del ceppo di batteri. Per raggiungere i buoni effetti della presente invenzione, si preferisce che il ceppo sia somministrato in una quantità ed una concentrazione sufficiente per far sì che esso possa essere presente in quantità significativa nell'intestino del paziente. Così, si preferisce che il ceppo sia somministrato in una composizione che contiene da

10<sup>3</sup> a 10<sup>13</sup> cellule per grammo, preferibilmente da 10<sup>8</sup> a 10<sup>12</sup> cellule per grammo e che la composizione sia somministrata secondo un tale regime per cui il paziente riceva da 100 mg a 100 grammi al giorno, preferibilmente da 1 grammo a 20 grammi al giorno, per un periodo da 1 a 365 giorni, preferibilmente da 3 a 60 giorni in caso di terapia o a cicli periodici in caso di profilassi. Il ceppo di batteri può essere somministrato in qualsiasi forma idonea per la somministrazione per via enterica, ad esempio capsule, compresse, o liquidi per somministrazione orale o liquidi per iniezione enterica.

Tipicamente, la somministrazione del ceppo di batteri secondo la presente invenzione potrà essere prescritta qualora vengano diagnosticati disordini metabolici degli acidi biliari. Tuttavia, nel caso della profilassi dei calcoli biliari, il ceppo può essere somministrato quando si è determinato che il soggetto appartiene ad un gruppo di popolazione a rischio, ad esempio in caso di gravidanza o con l'inizio di un programma di perdita di peso o dieta. Inoltre, il presente ceppo di batteri può essere somministrato dopo che un paziente ha tolto la cistifellea.

In una forma di realizzazione preferita, si prevede

la somministrazione contemporanea di lattulosio quando la malattia da trattare è la cirrosi. Convenientemente, il lattulosio viene somministrato in una quantità da 100 mg a 100 g, preferibilmente da 1 grammo a 20 grammi al giorno.

In un'altra forma di realizzazione preferita, si prevede la somministrazione contemporanea di preparati a base di acidi biliari quali l'acido ursodesossicolico o l'acido tauroursodesossicolico. Convenientemente, l'acido ursodesossicolico o l'acido tauroursodesossicolico vengono somministrati in una quantità da 10 a 3000 mg/giorno, preferibilmente da 50 a 800 mg/giorno.

La presente invenzione fornisce infine nuove composizioni farmaceutiche per curare e/o prevenire i disordini metabolici degli acidi biliari, che comprendono (a) un ceppo o più ceppi di batteri aventi una attività della 7 $\alpha$ -deidrossilasi di meno del 50% ed una attività di deconiugazione degli acidi biliari di meno del 50%. e (b) un eccipiente farmaceuticamente accettabile. Preferibilmente, le presenti composizioni farmaceutiche contengono il ceppo di batteri in una concentrazione da  $10^3$  a  $10^{13}$  cellule per grammo, preferibilmente da  $10^8$  a  $10^{12}$  cellule per grammo. L'eccipiente farmaceuticamente

accettabile può essere uno qualsiasi purché sia idoneo per la somministrazione per via enterica e sia compatibile con il ceppo di batteri, quale ad esempio destrosio, calcio carbonato assieme a diverse sostanze addizionali quali amido, gelatina, vitamina, sostanze antiossidanti, coloranti o sostanze correttive del gusto.

Come componente opzionale le composizioni dell'invenzione possono eventualmente contenere un farmaco compatibile con i batteri impiegati e che può potenziare l'attività dei principi attivi presenti. Si possono qui menzionare i farmaci anticolinergici, antistaminici, adrenergici, sedativi, antiinfiammatori, antipiretici, antisettici, analgesici, antireumatici, diuretici, epatoprotettori, antilipemici, ecc..

Quando si cura la cirrosi, si preferisce che la composizione farmaceutica comprenda anche lattulosio. Convenientemente, la composizione conterrà da 100 mg a 100 g, preferibilmente da 1 grammo a 20 grammi al giorno di lattulosio. Quando si cura la cirrosi biliare o l'epatite cronica, si preferisce che la composizione farmaceutica comprenda preparati a base di acidi biliari quali l'acido ursodesossicolico o l'acido



tauoursodesossicolico. Convenientemente, la composizione conterrà da 10 a 3000 mg/giorno di tali preparati di acidi biliari, preferibilmente da 50 a 800 mg al giorno di acido ursodesossicolico o di acido tauoursodesossicolico.

Altre caratteristiche dell'invenzione risulteranno chiare nel corso delle descrizioni che seguono di forme di realizzazione esemplificative che vengono date per illustrare l'invenzione e che non intendono limitarla.

#### ESEMPI

##### Esempio 1

Sono stati provati ceppi delle seguenti specie:  
Streptococcus thermophilus, Streptococcus faecium,  
Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus bulgaricus,  
Lactobacillus casei, Lactobacillus plantarum,  
Bifidobacterium infantis. Ogni ceppo ( $10^7$  CFU) è stato coltivato in duplicato in brodi nutritivi specifici (15 ml).

##### Elenco dei terreni culturali impiegati in funzione delle diverse specie:

Bifidobacterium infantis: MRS + 0,5% glucosio (aggiunto dopo sterilizzazione diluendo una soluzione al 20% sterile)

Streptococcus thermophilus: M17

Tutti i ceppi rimanenti: MRS

Composizione MRS brodo:

g/litro	peptone universale	10,0	g
	estratto di carne	5,0	g
	estratto di lievito	5,0	g
	D(+) - glucosio	20,0	g
	potassio fosfato bibasico	2,0	g
	Tween 80	1,0	g
	ammonio citrato bibasico	2,0	g
	sodio acetato	5,0	g
	magnesio solfato	0,1	g
	manganese solfato	0,05	g

Preparazione: disciogliere 50 g/l in acqua distillata, sterilizzare a 121°C per 15 min. - pH 6,5 + - 0,1 a 25°C

Composizione M17 brodo (Merck):

g/litro	peptone da farina di soia	5,0	g
	peptone da carne	2,5	g
	peptone da caseina	2,5	g
	estratto di lievito	2,5	g
	estratto di carne	5,0	g
	D(+) - lattosio	5,0	g
	acido ascorbico	0,5	g
	sodio-β-glicerofosfato	19,0	g
	magnesio fosfato	0,25	g

Preparazione: disciogliere 42,5 g/l in acqua distillata, sterilizzare a 121°C per 15 min. - pH 7,2 + - 0,1 a 25°C

Il Bifidobacterium infantis è stato coltivato in condizioni anaerobiche perchè è noto che è un batterio anaerobio. Dopo un periodo di incubazione di 24 ore a 37°C, a ciascun tubo è stata aggiunta una quantità di sale biliare equivalente a 30 mg, per ottenere una concentrazione finale di 2 mg/ml. Gli acidi biliari impiegati sono: acido glicocolico (GCA) e acido taurocolico (TCA), ottenuti da Sigma Chemicals. Ciascun acido biliare è stato aggiunto separatamente ad ogni serie di colture batteriche. Dopo 48 ore di incubazione sono stati aggiunti 3 ml di isopropanolo per 2 minuti. Quindi si è centrifugato a 400 giri per 15 minuti ed il supernatante è stato raccolto (5 ml). Il supernatante è stato mantenuto raffreddato a -30°C finché non è stato analizzato. E' stata determinata mediante HPLC (cromatografia liquida ad elevata prestazione) la percentuale di sale biliare coniugato presente, utilizzando un apparecchio Gilson dotato di un rilevatore Diode Array mod 1000 e una colonna a fase inversa Spherisorb 5 µm ODS 2 C18, una fase mobile composta da metanolo/tampone fosfato (20 mM pH 2,5 in acqua)/acqua/aceto nitrile (150:60:20:20), un flusso di 0,85 ml/min., ad una lunghezza d'onda di 205 nm; 100 µl di campione da

analizzare essiccati sotto azoto sono stati ripresi con 100  $\mu$ l di fase mobile contenente 7 $\alpha$ -OH-12 $\alpha$ -OH-dihydroxy-58-cholanic acid (Calbiochem U.S.A.) alla concentrazione di 2 mg/ml, usato come standard interno.

La percentuale del recupero dell'acido biliare incubato con le colture batteriche è stata calcolata facendo il rapporto tra area dell'acido biliare da ricercare (GCA o TCA) e quella dello standard interno. Quando la quantità dell'acido biliare coniugato trovato nelle colture batteriche dopo 48 ore di incubazione era meno del 50%, è stata eseguita la cromatografia su strato sottile (TLC) su piastre di gel di silice 60 per rilevare la presenza di CA e DCA, usando una fase mobile di cicloesano/isopropanolo/acido acetico (30:10:1 per volume). Su ogni piastra, sono stati messi a macchia 20  $\mu$ l dell'estratto alcolico del campione, 20  $\mu$ l di una soluzione di CA e DCA, e 20  $\mu$ l di CA, 20  $\mu$ l di DCA. Le piastre dopo sviluppo a temperatura ambiente, sono state trattate con acido solforico e riscaldate a 145°C fino a quando non sono apparse macchie colorate.

I risultati degli esperimenti di deconiugazione (Tabella I) mostrano che 5 su 17 ceppi provati con



GCA sono in grado di deconiugare completamente l'acido biliare aggiunto alla coltura, come precedentemente riportato in letteratura ed ampiamente noto a tutti i ricercatori. Sorprendentemente, dieci ceppi sono stati in grado di deconiugare GCA ma non completamente, in una gamma dal 9 al 90% (Tabella I). Non c'è stata differenza fra i batteri aerobi ed anaerobi. Due ceppi, Streptococcus thermophilus YS 52 e Bifidobacterium infantis Bi 6 non hanno alcuna attività deconiugante per GCA. Il ceppo YS 52 inoltre non attacca il legame acido biliare - taurina.

Solo uno su 17 ceppi provati è stato in grado di deconiugare completamente il TCA: il Bifidobacterium infantis Bi 6.

I risultati degli esperimenti di deidrossilazione (Tabella II) mostrano che su 17 ceppi solo uno (Bi 4) è in grado di deidrossilare completamente il GCA. Non deidrossilano affatto 6 ceppi: YS 52; SF 2; SF 4; LA 3; LA 10; Bi 6. Gli altri ceppi in varia percentuale che va dal 9% al 90% deidrossilano il GCA. Per il TCA, i ceppi che non lo deidrossilano sono 8: YS 52; SF 3; LA 3; LA 10; LB 1; LB 7; LB 77; LS 1;. Un ceppo - Bi 6 - deidrossila il TCA al 100%;

i rimanenti ceppi deidrossilano il TCA in percentuale variabile.

## TABELLA I

Percentuale di deconiugazione di GCA e TCA mediante colture batteriche dopo 48 ore di incubazione

CEPPO	No. DI ACCESSO	GCA%	TCA%
<u>Streptococcus thermophilus</u> YS 46	I-1668	9	9
<u>Streptococcus thermophilus</u> YS 48	I-1669	17	11
<u>Streptococcus thermophilus</u> YS 52	I-1670	0	0
<u>Streptococcus faecium</u> SF 2		100	3
<u>Streptococcus faecium</u> SF 3	I-1671	27	0
<u>Streptococcus faecium</u> SF 4		100	12
<u>Lactobacillus acidophilus</u> LA 3		100	80
<u>Lactobacillus acidophilus</u> LA 10		100	95
<u>Lactobacillus bulgaricus</u> LB 1	I-1664	9	0
<u>Lactobacillus bulgaricus</u> LB 3	I-1665	20	12
<u>Lactobacillus bulgaricus</u> LB 7	I-1666	14	0
<u>Lactobacillus bulgaricus</u> LB 77	I-1667	20	0
<u>Lactobacillus casei</u> LS 1	ATCC 25180	21	0
<u>Bifidobacterium infantis</u> Bi 2		80	15
<u>Bifidobacterium infantis</u> Bi 3		90	10
<u>Bifidobacterium infantis</u> Bi 4		100	26
<u>Bifidobacterium infantis</u> Bi 6		0	100

## TABELLA II

Percentuale di deidrossilazione di GCA e TCA  
mediante colture batteriche dopo 48 ore di  
incubazione.

CEPPO	NO. DI ACCESSO	GCA%	TCA%
<u>Streptococcus thermophilus</u> YS 46	I-1668	9	9
<u>Streptococcus thermophilus</u> YS 48	I-1669	17	11
<u>Streptococcus thermophilus</u> YS 52	I-1670	0	0
<u>Streptococcus faecium</u> SF 2		0	3
<u>Streptococcus faecium</u> SF 3	I-1671	27	0
<u>Streptococcus faecium</u> SF 4		0	12
<u>Lactobacillus acidophilus</u> LA 3		0	0
<u>Lactobacillus acidophilus</u> LA 10		0	0
<u>Lactobacillus bulgaricus</u> LB 1	I-1664	9	0
<u>Lactobacillus bulgaricus</u> LB 3	I-1665	20	12
<u>Lactobacillus bulgaricus</u> LB 7	I-1666	14	0
<u>Lactobacillus bulgaricus</u> LB 77	I-1667	20	0
<u>Lactobacillus casei</u> LS 1	ATCC 25180	21	0
<u>Bifidobacterium infantis</u> Bi 2		80	15
<u>Bifidobacterium infantis</u> Bi 3		90	10
<u>Bifidobacterium infantis</u> Bi 4		100	26
<u>Bifidobacterium infantis</u> Bi 6		0	100

I seguenti ceppi sono stati depositati presso il  
CNCM - Collection Nationale de Cultures de  
Microorganismes - Institut Pasteur ai numeri di



accesso sotto riportati:

Streptococcus thermophilus YS 46: I-1668

Streptococcus thermophilus YS 48: I-1669

Streptococcus thermophilus YS 52: I-1670

Streptococcus faecium SF 3: I-1671

Lactobacillus bulgaricus LB 1: I-1664

Lactobacillus bulgaricus LB 3: I-1665

Lactobacillus bulgaricus LB 7: I-1666

Lactobacillus bulgaricus LB 77: I-1667

Il seguente ceppo è già depositato presso l'ATCC USA

- American Type Culture Collection USA al numero di  
accesso sotto riportato:

Lactobacillus casei LS 1: ATCC 25180

I seguenti ceppi sono invece custoditi presso il  
Centro Ricerche Sitia-Yomo S.p.A., contraddistinti  
dalle sigle sotto riportate:

Streptococcus faecium SF 2: SF 2

Streptococcus faecium SF 4: SF 4

Lactobacillus acidophilus LA 3: LA 3

Lactobacillus acidophilus LA 10: LA 10

Bifidobacterium infantis Bi 2: Bi 2

Bifidobacterium infantis Bi 3: Bi 3

Bifidobacterium infantis Bi 4: Bi 4

Bifidobacterium infantis Bi 6: Bi 6

Questi risultati dimostrano che la maggioranza dei

ceppi da noi provati ha una bassa capacità di deconjugare gli acidi biliari e che vi sono ceppi che non deconjugano affatto. Questa osservazione è sorprendente in considerazione che si sapeva che i batteri costituenti la flora intestinale deconjugavano i sali biliari. Inoltre, è evidente che gli enzimi dei ceppi sono selettivi per lo specifico acido biliare legato sulla catena laterale. In questo studio, l'esempio più chiaro viene offerto dal Bifidobacterium infantis Bi 6. Questo ceppo è in grado di non deconjugare l'acido biliare glicina-coniugato ma è in grado di deconjugare totalmente l'acido biliare taurina-coniugato. Alcuni altri ceppi (LS 1, LB 1, LB 7, LB 77, SF 3) non sono in grado di deconjugare TCA ma sono in grado di deconjugare GCA in una certa misura.

In conclusione, sono stati scoperti dei ceppi che hanno una scarsa od assente capacità di deconjugare e di deidrossilare.

#### Esempio 2

Tre volontari sani sono stati testati per il loro contenuto di acidi biliari seguendo un trattamento con una preparazione di batteri lattici contenente  $1 \times 10^{11}$  cellule di Streptococcus thermophilus YS 52

per grammo per un totale giornaliero di 6 g per 28 giorni. Prima di iniziare il trattamento e dopo 12 ore di inanizione, i soggetti sono stati intubati e la bile della cistifellea, a seguito di stimolazione con ceruletide, è stata raccolta e congelata a -80°C. E' stata accertata la contrazione della cistifellea mediante ecografia e la posizione del tubo, nella seconda parte del duodeno è stata controllata con Rx (fluoroscopia).

Dopo un trattamento di 4 settimane, i soggetti hanno subito una seconda intubazione e raccolta di bile. I campioni di bile sono stati poi testati per il loro contenuto di alcuni acidi biliari, come precedentemente descritto. I risultati sono indicati in Tabella III.

Tabella III

Acido biliare	Paziente # 1		Paziente # 2		Paziente # 3	
	Prima	Dopo	Prima	Dopo	Prima	Dopo
Glichenodesossicolico	32	15	22	15	28	12
Glicodesossicolico	6	5	9	2	4	3
Glicoursodesossicolico	1	5	1	7	1	4
Taurocolico	9	26	15	25	12	21
Taurodesossicolico	1	3	5	8	3	9

NOTA: (gli acidi biliari sono elencati in ordine di idrofilicità, ovvero in ordine inversamente proporzionale alla detergenza)

Taurocolico

Taurodesossicolico

Glicoursodesossicolico

Glicodesossicolico

Glichenodesossicolico

Questo esperimento conferma quanto visto nell'esempio n. 1, ovvero una minore deconjugazione in uno degli acidi biliari primari se vengono somministrati i batteri oggetto della presente invenzione. Il risultato che si ottiene è un mantenimento più lungo degli acidi biliari primari nel circolo entero-epatico.



Le proprietà degli acidi biliari sono ripresi nella nota in Tabella III. Così, secondo questi risultati, la somministrazione di ceppi scelti di batteri può ridurre il potere di detergere e quindi l'attività citolitica degli acidi biliari.

#### Esempio 3

Quattordici pazienti con epatite cronica sono stati trattati con una preparazione batterica contenente Streptococcus thermophilus YS 46, YS 48 (due ceppi), Lactobacillus bulgaricus LB 1, LB 7, LB 77 (tre ceppi) e Lactobacillus casei LS 1. Ogni ceppo era stato portato alla concentrazione di  $150 \times 10^9$  cellule per grammo prima di essere miscelato con gli altri. E' stata somministrata una miscela dei ceppi batterici sopra citati pari a 6 grammi per giorno, per 28 giorni. Sono stati misurati gli enzimi epatici prima e dopo il trattamento, ed i risultati sono rappresentati in Tabella IV.

Tabella IV

Influenza del trattamento con miscela batterica su  
enzimi epatici aspartico transaminasi (AST; SGOT) e  
alanina transaminasi (ALT; SGPT)

Paziente	AST(SGOT)		ALT(SGPT)	
	prima	dopo	prima	dopo
# 1	92	59	102	46
# 2	89	67	96	42
# 3	174	86	97	39
# 4	121	91	102	66
# 5	116	81	111	55
# 6	156	87	94	76
# 7	163	66	69	37
# 8	78	64	122	57
# 9	109	39	87	86
# 10	166	70	102	48
# 11	56	24	118	62
# 12	131	83	96	79
# 13	137	86	94	74
# 14	84	87	144	114
Media	119	71	102	63
Deviazione standard	36	19	17	21
Test di Student				
per dati accoppiati	p<0,001		p<0,001	
Ovviamente, sono possibili numerose modifiche e				

varianti della presente invenzione alla luce degli insegnamenti di cui sopra. Va pertanto compreso che, entro l'ambito delle allegate rivendicazioni, l'invenzione può essere messa in pratica in modo diverso da come qui specificatamente descritto.

## RIVENDICAZIONI

1) Ceppo di batteri caratterizzato dal fatto di presentare:

(a) attività della 7a-deidrossilasi inferiore al 50%; e

(b) attività di deconiugazione degli acidi biliari inferiore al 50%,

e loro discendenti, mutanti e derivati che conservano le attività (a) e (b).

2) Ceppo di batteri secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che è scelto tra Streptococcus thermophilus, Streptococcus faecium, Lactobacillus bulgaricus e Lactobacillus casei.

3) Ceppo secondo la rivendicazione 2, caratterizzato dal fatto che è il ceppo di Streptococcus thermophilus YS 52 depositato presso il CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur al numero di accesso I-1670.

4) Ceppo secondo la rivendicazione 2, caratterizzato dal fatto che è il ceppo di Streptococcus thermophilus YS 46 depositato presso il CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur al numero di accesso I-1668.

5) Ceppo secondo la rivendicazione 2, caratterizzato dal fatto che è il ceppo di Streptococcus



thermophilus YS 48 depositato presso il CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur al numero di accesso I-1669.

6) Ceppo secondo la rivendicazione 2, caratterizzato dal fatto che è il ceppo di Streptococcus faecium SF 3 depositato presso il CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur al numero di accesso I-1671.

7) Ceppo secondo la rivendicazione 2, caratterizzato dal fatto che è il ceppo di Lactobacillus bulgaricus LB 1 depositato presso il CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur al numero di accesso I-1664.

8) Ceppo secondo la rivendicazione 2, caratterizzato dal fatto che è il ceppo di Lactobacillus bulgaricus LB 3 depositato presso il CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur al numero di accesso I-1665.

9) Ceppo secondo la rivendicazione 2, caratterizzato dal fatto che è il ceppo di Lactobacillus bulgaricus LB 7 depositato presso il CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur al numero di accesso I-1666.

10) Ceppo secondo la rivendicazione 2, caratterizzato dal fatto che è il ceppo di

Lactobacillus bulgaricus LB 77 depositato presso il CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur al numero di accesso I-1667.

11) Ceppo secondo la rivendicazione 2, caratterizzato dal fatto che è il ceppo di Lactobacillus casei LS 1 depositato presso l'ATCC USA - American Type Culture Collection USA al numero di accesso ATCC 25180.

12) Composizione farmaceutica somministrabile per via enterale per la prevenzione e terapia delle malattie provocate o associate all'alterato metabolismo degli acidi biliari, caratterizzata dal fatto che comprende una quantità efficace ad indurre un effetto normalizzante su tale alterato metabolismo in un paziente che ne è affetto, di

(1) almeno un ceppo di batteri dotato di:

(a) attività della 7α-deidrossilasi inferiore al 50%; e

(b) attività di deconiugazione degli acidi biliari inferiore al 50%,

e loro discendenti, mutanti e derivati che conservano le attività (a) e (b)

(2) un eccipiente farmaceuticamente accettabile.

13) Composizione secondo la rivendicazione 12,

caratterizzata dal fatto che detto almeno un ceppo di batteri è scelto tra Streptococcus thermophilus, Streptococcus faecium, Lactobacillus bulgaricus e Lactobacillus casei.

14) Composizione secondo la rivendicazione 13, caratterizzata dal fatto che il ceppo di batteri è Streptococcus thermophilus YS 52 depositato presso il CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur al numero di accesso I-1670.

15) Composizione secondo la rivendicazione 13, caratterizzata dal fatto che il ceppo di batteri è Streptococcus thermophilus YS 46 depositato presso il CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur al numero di accesso I-1668.

16) Composizione secondo la rivendicazione 13, caratterizzata dal fatto che il ceppo di batteri è Streptococcus thermophilus YS 48 depositato presso il CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur al numero di accesso I-1669.

17) Composizione secondo la rivendicazione 13, caratterizzata dal fatto che il ceppo di batteri è Streptococcus faecium SF 3 depositato presso il CNCM

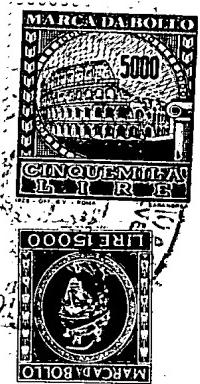
- Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur al numero di accesso I-1671.

18) Composizione secondo la rivendicazione 13, caratterizzata dal fatto che il ceppo di batteri è Lactobacillus bulgaricus LB 1 depositato presso il CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur al numero di accesso I-1664.

19) Composizione secondo la rivendicazione 13, caratterizzata dal fatto che il ceppo di batteri è Lactobacillus bulgaricus LB 3 depositato presso il CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur al numero di accesso I-1665.

20) Composizione secondo la rivendicazione 13, caratterizzata dal fatto che il ceppo di batteri è Lactobacillus bulgaricus LB 7 depositato presso il CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur al numero di accesso I-1666.

21) Composizione secondo la rivendicazione 13, caratterizzata dal fatto che il ceppo di batteri è Lactobacillus bulgaricus LB 77 depositato presso il CNCM - Collection Nationale de Cultures de



Microorganismes - Institut Pasteur al numero di  
accesso I-1667.

22) Composizione secondo la rivendicazione 13,  
caratterizzata dal fatto che il ceppo di batteri è  
Lactobacillus casei LS 1 depositato presso l'ATCC  
USA - American Type Culture Collection USA al numero  
di accesso ATCC 25180.

23) Composizione secondo una qualsiasi delle  
rivendicazioni 12-22, caratterizzata dal fatto che  
comprende da  $10^3$  a  $10^{13}$  cellule del ceppo di batteri  
per grammo di composizione.

24) Composizione secondo una qualsiasi delle  
rivendicazioni 12-23, caratterizzata dal fatto che  
comprende ulteriormente lattulosio.

25) Composizione secondo una qualsiasi delle  
rivendicazioni 12-23, caratterizzata dal fatto che  
comprende ulteriormente preparati a base di acidi  
biliari quali acido ursodesossicolico e acido  
tauoursodesossicolico.

26) Uso di almeno un ceppo di batteri caratterizzato  
dal fatto che presenta:

- (a) attività della 7a-deidrossilasi inferiore al 50%; e
- (b) attività di deconiugazione degli acidi biliari  
inferiore al 50%,

e loro discendenti, mutanti e derivati che conservano le attività (a) e (b), per preparare una composizione farmaceutica atta alla prevenzione ed alla terapia delle malattie provocate o associate all'alterato metabolismo degli acidi biliari.

27) Uso secondo la rivendicazione 26, caratterizzato dal fatto che il ceppo di batteri è scelto tra Streptococcus thermophilus, Streptococcus faecium, Lactobacillus bulgaricus e Lactobacillus casei.

28) Uso secondo la rivendicazione 27, caratterizzato dal fatto che il ceppo di batteri è il ceppo Streptococcus thermophilus YS 52 depositato presso il CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur al numero di accesso I-1670.

29) Uso secondo la rivendicazione 27, caratterizzato dal fatto che il ceppo di batteri è il ceppo Streptococcus thermophilus YS 46 depositato presso il CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur al numero di accesso I-1668.

30) Uso secondo la rivendicazione 27, caratterizzato dal fatto che il ceppo di batteri è il ceppo Streptococcus thermophilus YS 48 depositato presso il CNCM - Collection Nationale de Cultures de

Microorganismes - Institut Pasteur al numero di  
accesso I-1669.

31) Uso secondo la rivendicazione 27, caratterizzato  
dal fatto che il ceppo di batteri è il ceppo  
Streptococcus faecium SF 3 depositato presso il CNCM  
- Collection Nationale de Cultures de  
Microorganismes - Institut Pasteur al numero di  
accesso I-1671.

32) Uso secondo la rivendicazione 27, caratterizzato  
dal fatto che il ceppo di batteri è il ceppo  
Lactobacillus bulgaricus LB 1 depositato presso il  
CNCM - Collection Nationale de Cultures de  
Microorganismes - Institut Pasteur al numero di  
accesso I-1664.

33) Uso secondo la rivendicazione 27, caratterizzato  
dal fatto che il ceppo di batteri è il ceppo  
Lactobacillus bulgaricus LB 3 depositato presso il  
CNCM - Collection Nationale de Cultures de  
Microorganismes - Institut Pasteur al numero di  
accesso I-1665.

34) Uso secondo la rivendicazione 27, caratterizzato  
dal fatto che il ceppo di batteri è il ceppo  
Lactobacillus bulgaricus LB 7 depositato presso il  
CNCM - Collection Nationale de Cultures de  
Microorganismes - Institut Pasteur al numero di

accesso I-1666.

35) Uso secondo la rivendicazione 27, caratterizzato dal fatto che il ceppo di batteri è il ceppo Lactobacillus bulgaricus LB 77 depositato presso il CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur al numero di accesso I-1667.

36) Uso secondo la rivendicazione 27, caratterizzato dal fatto che il ceppo di batteri è il ceppo Lactobacillus casei LS 1 depositato presso l'ATCC USA - American Type Culture Collection USA al numero di accesso ATCC 25180.

p.i. di Renata Maria Anna CAVALIERE ved. VESELY  
Claudio DE SIMONE



**MINISTRY OF INDUSTRY, TRADE AND HANDICRAFTS**

**CENTRAL PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

Certificate of the copy of the documents relating to the **PATENT**  
**APPLICATION n. MI96A 000468**

I declare that the appended copy is in conformity with the original documents filed with the above mentioned patent Application which will appear from the appended Certificate of Filing.

Rome, on 10 February 1997

THE DIRECTOR  
OF THE DEPARTMENT  
(Dott. Giuseppe PETRUCCI)

MINISTRY OF COMMERCE INDUSTRY, TRADE AND HANDICRAFTS  
GENERAL PATENT OFFICE - ROME

PATENT APPLICATION FOR INDUSTRIAL INVENTION

A. APPLICANT(1) N.G.  
1) Renata Maria Anna CAVALIERE ved. VESELY PF  
residence MILANO code CVLRNT24H43H501N  
2) Claudio DE SIMONE PF  
residence ARDEA RM code DSMCLD51C22H501U  
B. APPLICANT'S ATTORNEY AT U.C.B.  
surname name Ing. Martino SALVADORI fiscal code  
belongings studios BUGNION S.p.A.  
Street Via Carlo Farini n.81 City MILANO cap.20159 Province MILANO  
C. ELECTIVE DOMICILE CONSIGNEE  
Street n. City cap. Province  
D. TITLE proposed class (section.cl.) group/subgroup  
"STRAINS OF BACTERIA, PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING ONE  
OR MORE OF SUCH STRAINS AND USE OF SAME FOR PREVENTING AND  
TREATING DISEASES ASSOCIATED WITH OR CAUSED BY AN ALTERED  
METABOLISM OF THE BILE ACIDS"  
ADVANCED PUBLIC ACCESSIBILITY YES NO IF REQUEST DATE REGISTER N.  
E. DESIGNED INVENTORS:  
1. Renata Maria Anna CAVALIERE ved. VESELY 3.surname,name  
2. Claudio DE SIMONE 4.surname,name  
F. PRIORITY  
1. country or organization code of priority appl.n. enclosed s/r  
RESERVE RELEASE  
Date register n.  
G. QUALIFIED CENTRE FOR MICROORGANISM CULTURE COLLECTION, name  
AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC) (USA) and COLLECTION  
NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES (CNCM) (FRANCE)  
H. SPECIAL NOTES: (Stamps Lires 20.000)  
ENCLOSURES:  
DOC 1) EX.1 pag. 37 abstract with main drawing,descr. with claims  
(1 copy)  
DOC 2) EX 0 pag. 00 drawing (compulsory if mentioned in  
description 1 copy)  
DOC 3) EX 1 power of Attorney or full power of attorney  
DOC.4) EX.1 inventor designation  
DOC.5) EX.0 priority documents with Italian translation  
DOC.6) EX 0 authorization or deed of assignment  
DOC.7) EX 0 full name of the applicant  
8) Certificate of Payment of Lires five hundred sixty-five thousand  
only  
COMPILED on 11.03.1996 APPLICANT signs by proxy the Attorney  
CONTINUES YES/NO NO Ing. Martino SALVADORI  
CERTIFIED TRUE COPY OF THE PRESENT ACT IS REQUESTED YES/NO YES  
PROVINCIAL OFFICE OF INDUSTRY, TRADE AND HANDICRAFTS of MILAN code 15  
FILING RECEIPT NUMBER OF APPLICATION MI96 A 000468 Reg. A  
YEARS NINETEEN NINETYSIX day ELEVENTH month MARCH  
the above-mentioned applicant(s) has (have) presented to me  
undersigned the present application, with n. 00 additional sheets for  
the granting of the aforesaid patent.  
VARIOUS NOTES ISSUED BY THE OFFICE

THE ATTORNEY  
(Illegible signature)

office stamp

THE CERTIFYING OFFICE  
CORTONESI MAURIZIO

Prospect A

Abstract of industrial invention with main drawing, description and claim

Application n.	Reg. A	filing date
Patent n.		granting date

D. Title

STRAINS OF BACTERIA, PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING ONE OR MORE OF SUCH STRAINS AND USE OF SAME FOR PREVENTING AND TREATING DISEASES ASSOCIATED WITH OR CAUSED BY AN ALTERED METABOLISM OF THE BILE ACIDS.

L. Abstract

" Stamps of L. 20.000

Use of strains of bacteria characterized by exhibiting:  
(a) a  $7\alpha$ -dehydroxylase activity of less than 50%, and  
(b) a bile acid deconjugation activity of less than 50%,  
and descendants, mutants and derivatives thereof  
preserving activities (a) and (b); a pharmaceutical  
composition using one or more of such strains and use of  
same for preventing and treating diseases associated  
with or caused by an altered metabolism of the bile  
acids.

M.Drawing

S P E C I F I C A T I O N

annexed to the Patent Application entitled:

"STRAINS OF BACTERIA, PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING ONE OR MORE OF SUCH STRAINS AND USE OF SAME FOR PREVENTING AND TREATING DISEASES ASSOCIATED WITH OR CAUSED BY AN ALTERED METABOLISM OF THE BILE ACIDS".

Applicant : 1) Renata Maria Anna CAVALIERE ved. VESELY, of  
Italian nationality, residing in Milan  
2) Claudio DE SIMONE, of Italian nationality,  
residing in Ardea (Rome)

Patent Attorneys: Ing. Giuseppe Righetti recorded at Albo at n. 7

Ing. Carlo Raoul Ghioni recorded at Albo at n. 280

Ing. Martino Salvadori recorded at Albo at n. 438

Ing. Giuseppe Pirillo recorded at Albo at n. 518

Ing. Luca Sutto recorded at Albo at n. 556

of BUGNION S.p.A., Via C. Farini 81 - MILANO

Filed on :

at No.:

STRAINS OF BACTERIA, PHARMACEUTICAL COMPOSITION  
CONTAINING ONE OR MORE OF SUCH STRAINS AND USE OF SAME  
FOR PREVENTING AND TREATING DISEASES ASSOCIATED WITH OR  
CAUSED BY AN ALTERED METABOLISM OF THE BILE ACIDS

5

The present invention relates to strains of bacteria, a pharmaceutical composition containing one or more of such strains and the use of same for preventing and treating diseases associated with or caused by an 10 altered metabolism of the bile acids.

Hepatic bile is a pigmented isotonic fluid with an electrolyte composition resembling blood plasma. Major components of bile include water (82 percent), bile 15 acids (12 percent), lecithin and other phospholipids (4 percent), and unesterified cholesterol (0.7 percent). Other constituents include conjugated bilirubin, proteins, electrolytes, mucus and the final products of hepatic transformation of drugs, hormones, etc. The 20 liver production of bile, in basal conditions, is approximately 500-1000 ml/day.

The primary bile acids, cholic acid (CA) and chenodeoxycholic acid (CDCA), are synthesized from 25 cholesterol in the liver, conjugated with glycine or taurine, and excreted into the bile. Secondary bile acids, including deoxycholic acid (DCA) and lithocholic acid (LA), are formed in the colon as bacterial metabolites of the primary bile acids. Other bile acids, 30 called tertiary bile acids (e.g.: ursodeoxycholic acid - UDCA), are formed in the gut following the enzymatic epimerization of -OH groups on sterol rings by the intestinal flora.

35 In normal bile, the ratio of glycine to taurine conjugates is about 2:1, while in patients with cholestasis, increased concentrations of sulfate and glucuronide conjugates of bile acids are often found.

The intestinal microflora transforms the bile acids into different metabolites. These biotransformations include the hydrolysis of the bond between the bile acid and taurine or glycine, with formation of unconjugated or free bile acids and taurine or glycine. The unconjugated bile acids are therefore made available for the oxidation of the hydroxylic groups in positions C3, C7, and C12 and for the dehydroxylation in positions 7 $\alpha$  and 7 $\beta$ . This latter transformation leads to the formation of the secondary bile acids DCA and LA. The primary bile acids, deconjugated but not transformed, and the secondary biliary acids are reabsorbed from the gut lumen and enter the portal bloodstream, then are taken up by hepatocytes, conjugated with glycine or taurine and resecreted into the bile (enterohepatic circulation).

Normally, the bile acid pool circulates approximately 5 to 10 times daily. Intestinal absorption of the pool is about 95% efficient, so fecal loss of bile acids is in the range of 0.3 to 0.6 g/day. The fecal loss is compensated by an equal daily synthesis.

For this reason the composition of the pool of biliary acids present in the bile is the result of complex interactions occurring between the liver and the microflora enzymes.

Deconjugation activity is a characteristic shared by many bacteria, aerobes and anaerobes, but is particularly common among the obligate anaerobic bacteria, i.e. Bacteroides, Eubacteria, Clostridia, Bifidobacteria, etc. The majority of the bacteria is active against both glycine and taurine conjugates; however, some of them have a certain degree of specificity, depending from the bound amino acid, and the number of hydroxides bound to the steroid nucleus. The free biliary acids obtained following the action of

the bacterial hydrolases can undergo the oxidation of the hydroxide groups present at the C3, C7 and C12 positions by the hydroxysteroidodehydrogenase.

- 5 The interest in the metabolic disorders of biliary acids comes from the hypothesis that biliary acids and/or metabolites thereof are involved in the pathogenesis of some hepato-biliary and gastroenterologic diseases: biliary dyspepsia, cholelithiasis, acute and chronic  
10 hepatopathies, inflammatory deseases of the colon, etc.

Very often in literature the hydrophobicity of the bile acid is correlated with detergency; the secondary bile acids are more hydrophobic than the primary bile acids,  
15 the deoxycholic acid (DCA) being actually more detergent than the cholic acid (CA). Therefore an increased concentration of DCA in the bile may involve:  
a) an augmentation of the secretion of cholesterol, with increased saturation index;  
20 b) a cytotoxic effect on the liver cells.

For this reason a qualitative modification of the bile acids pattern could be a decisive factor, especially in treating the above mentioned pathologies.

25

No bacteria strains have been found that are capable of qualitatively modifying the bile acid pattern.

Thus, there remains a need for effective bacterial  
30 strains or compositions that, by reducing the  $7\alpha$ -dehydroxylase activity and at the same time deconjugation, can be used for treating and/or preventing deseases associated with metabolic disorders of the biliary acids.

35

It is an object of the present invention to use bacteria strains characterized in that they exhibit: (a) a  $7\alpha$ -dehidroxylase activity of less than 50%, and (b) a bile

acid deconjugation activity of less than 50%, and descendants, mutants and derivatives thereof preserving activities (a) and (b); a pharmaceutical composition using one or more of such strains and the use of same 5 for preventing and/or treating deseases associated with or caused by an altered metabolism of the bile acids.

- The foregoing and other objects, which will become more apparent during the following detailed description, have 10 been achieved by the inventors' discovery that bacteria strains exist which have a reduced or zero  $7\alpha$ -dehydroxylase activity and a reduced or zero ability to deconjugate bile acids. This is in contrast with the previous known art. Accordingly, the present invention 15 provides the use of such strains to modify the bile acid metabolism in a useful manner to prevent or treat deseases caused by or associated with metabolic disorders of the biliary acids.
- 20 The present invention also provides a pharmaceutical composition for treating and/or preventing metabolic disorders of the biliary acids by administering to a patient in need thereof one or more strains of bacteria which have a  $7\alpha$ -dehydroxylase activity of less than 50% 25 and a conjugated bile acid deconjugation activity of less than 50%.

In the context of the present invention, the metabolic disorders of the biliary acids are implicated in the 30 pathogenesis of liver deseases and deseases of the digestive apparatus comprising blind loop syndrome, biliary gallstones, cirrhosis, chronic hepatopathies, acute hepatopathies, cystic fibrosis, intrahepatic cholestasis, intestinal inflammatory deseases, 35 colonpathies, malabsorption. The present pharmaceutical compositions may also be used to prevent the onset of biliary gallstones in women during pregnancy or subsequent periods and in subjects

undergoing weight-loss programmes or diets.

The  $7\alpha$ -dehydroxylase activity of the bacteria strain should be less than 50%. The  $7\alpha$ -dehydroxylase activity values are those drawn from Example 1 below. Specifically, the  $10^7$  cells of the strain in question are incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 48 hours, in 15 ml of the specific culture medium with the addition of 2 mg/ml of glycocholic acid (GCA) or 2 mg/ml of taurocholic acid (TCA), and then the amount of  $7\alpha$ -dehydroxylated product is measured. The percentage value for the  $7\alpha$ -dehydroxylase activity is calculated by the following formula:

$$15 \quad 7\alpha\text{-dehydroxylase activity} = \frac{\text{mass of } 7\alpha\text{-dehydroxylated product after 48 hours of incubation}}{\text{mass of GCA or TCA at the start of incubation}} \times 100$$

Based on the above, the bacteria strain to be administered should in addition have a conjugated bile acid deconjugation activity of less than 50%. The ability to deconjugate bile acid is determined by using the same incubation procedure described for measuring the  $7\alpha$ -dehydroxylase activity followed by measuring the amount of deconjugated product formed. The deconjugation activity is calculated using the following formula:

$$30 \quad \text{Deconjugation activity} = \frac{\text{mass of deconjugated GCA or TCA after 48 hrs of incubation}}{\text{mass of GCA or TCA at the start of incubation}} \times 100$$

The bacteria strains of the present invention may be administered enterically. Preferably, the bacteria strains of the present invention are administered orally.

Although a single bacteria strain may be administered, it is also possible to administer a mixture of two or

more bacteria according to the present invention.

Although the exact dosage of bacteria to be administered will vary with the condition and size of the patient, 5 the exact disease being treated, and the identity of the strains being administered, good results have been achieved by administering  $10^8$  to  $10^{12}$  cells of the preparation/g, preferably  $10^9$  to  $10^{12}$  cells of the bacteria strain/g. To achieve the good effects of the 10 present invention, it is preferred that the strain be administered in an amount and a concentration sufficient to result in the intestines of the patient being populated with an important amount thereof. Thus, it is preferred that the strain be administered in a 15 composition which contains  $10^8$  to  $10^{12}$  cells of the strain/g, preferably  $10^9$  to  $10^{12}$  cells of the strain/g and that the composition be administered in such a regimen so that the patient receives 100 mg to 100 g of the strain/day, preferably 1 g to 20 g of the 20 strain/day, for a period of 1 to 365 days, preferably 3 to 60 days in case of therapy, or according to periodical cycles in case of prophylaxis. The bacteria strain may be administered in any form suitable for enteral administration, such as capsules, tablets, or 25 liquids for oral administration or liquids for enteral injection.

Typically, the administration of the bacteria strain according to the present invention can be prescribed 30 after the diagnosis of metabolic disorders of the biliary acids. However, in the case of the prophylaxis of biliary gallstones, the strain may be administered when the subject is determined to belong to an at-risk population, such as becoming pregnant or beginning a 35 weight-loss program or diet. In addition, the present strain of bacteria may be administered after a patient has had their gallbladder removed.

In a preferred embodiment, the coadministration of lactulose is provided when the disease being treated is cirrhosis. Suitably, the lactulose is administered in an amount of 100 mg to 100 g/day, preferably 1 g to 20 g/day.

In another preferred embodiment, the coadministration of bile acid-based preparations, such as ursodeoxycholic acid or taurooursodeoxycholic acid, is provided.

10 Suitably, the ursodeoxycholic or taurooursodeoxycholic acid is administered in an amount of 10 to 3,000 mg/day, preferably 50 to 800 mg/day.

The present invention finally provides novel pharmaceutical compositions for treating and/or preventing the metabolic disorders of the biliary acids which comprise (a) one or more strains of bacteria having a  $7\alpha$ -dehydroxylase activity of less than 50%, and a bile acid deconjugation activity of less than 50%, and

20 (b) a pharmaceutically acceptable carrier. Preferably, the present pharmaceutical compositions contain the strain of bacteria in a concentration of  $10^3$  to  $10^{12}$  cells/g, preferably  $10^8$  to  $10^{12}$  cells/g. The pharmaceutically acceptable carrier may be any which is

25 suitable for enteral administration and is compatible with the strain of bacteria, such as dextrose, calcium carbonate together with different additional substances such as starch, gelatin, vitamins, antioxidants, stains or taste-improving substances.

30 As an optional component, the compositions of the invention may possibly contain a drug compatible with the bacteria employed and capable of potentiating the activity of the active ingredients present.

35 Anticholinergic drugs, antihistamines, adrenergic and anti-inflammatory drugs, sedatives, antipyretics, antirheumatic agents, analgesic drugs, diuretics, antiseptic agents, antilipemic and hepatoprotective

drugs, etc. may be herein mentioned.

- When treating cirrhosis, it is preferred that the pharmaceutical composition further comprise lactulose.
- 5 Suitably, the composition will contain 100 mg to 100 g/day, preferably 1 g to 20 g/day of lactulose. When treating biliary cirrhosis and chronic hepatitis, it is preferred that the pharmaceutical composition comprise bile acid-based preparations, such as ursodeoxycholic
- 10 acid or tauroursodeoxycholic acid. Suitably, the composition will contain 10 to 3,000 mg/day of such bile acid preparations, preferably 50 to 800 mg/day of ursodeoxycholic acid or tauroursodeoxycholic acid.
- 15 Other features of the invention will become apparent in the course of the following descriptions of exemplary embodiments which are given for illustration of the invention and are not intended to be limiting thereof.

20

#### EXAMPLES

##### Example 1

- Strains of the following species have been tested:
- 25 Streptococcus thermophilus, Streptococcus faecium, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus casei, Lactobacillus plantarum, Bifidobacterium infantis. Each strain ( $10^7$  CFU) was cultivated in duplicate in specific nutrient broths (15 ml).

30

##### List of the employed culture media depending on the different species

Bifidobacterium infantis: MRS + 0.5% glucose (added after sterilization  
by diluting a 20% sterile solution)

Streptococcus thermophilus: M17

35 All the remaining strains MRS

##### Composition of the MRS broth:

g/liter	universal peptone	10.0 g
	meat extract	5.0 g

	yeast extract	5.0 g
	D(+) -glucose	20.0 g
	potassium hydrogen phosphate	2.0 g
	Tween 80	1.0 g
5	dibasic ammonium citrate	2.0 g
	sodium acetate	5.0 g
	magnesium sulfate	0.1 g
	manganous sulfate	0.05 g

Preparation: dissolve 50 g/l in distilled water, sterilized at 121°C for  
10            15 minutes - pH 6.5 + - 0.1 at 25°C

Composition M17 broth (Merck):

g/liter	soybean flour peptone	5.0 g
	meat peptone	2.5 g
	casein peptone	2.5 g
15	yeast extract	2.5 g
	meat extract	5.0 g
	D(+) -lactose	5.0 g
	ascorbic acid	0.5 g
	sodium-β-glycerophosphate	19.0 g
20	magnesium phosphate	0.25 g

Preparation: dissolve 42.5 g /l in distilled water, sterilized at 121°C for  
15 minutes - pH 7.2 + - 0.1 at 25°

Bifidobacterium infantis was cultivated under anaerobic  
25 conditions since it is known that it is an anaerobic  
bacterium. After a 24 hours of incubation at 37°C to  
each tube was added an amount of bile salt equivalent to  
30 mg in order to obtain a final concentration of 2  
mg/ml. The bile acids employed are: glycocholic acid  
30 (GCA) and taurocholic acid (TCA), obtained from Sigma  
Chemicals. Each bile acid was added separately to each  
series of bacterial cultures.

After 48 hours of incubation, isopropanol, 3 ml, was  
35 added for 2 minutes. Then it was centrifuged at 400 rpm  
for 15 minutes and the supernatant was collected (5 ml).  
The supernatant was kept refrigerated at -30°C until it  
was analyzed. The percentage of conjugated bile salt

present was determined by HPLC (high performance liquid chromatography) utilizing a Gilson apparatus equipped with a detector Diode array mod 1000 and a Spherisorb 5  $\mu\text{m}$  ODS 2 C18 reverse phase column, a mobile phase composed by methanol/buffered phosphate (20 mMol), pH 2.5 in water/acetonitrile/water (150:60:20:20 by volume), a fluid speed of 0.85 ml/min, at a wavelength of 205 nm; 100  $\mu\text{l}$  of the sample to be tested, dried under nitrogen, were extracted with 100  $\mu\text{l}$  of the mobile phase containing as an internal standard 7 $\alpha$ -OH-12 $\alpha$ -OH-dihydroxy-5 $\beta$ -cholanic acid (Calbiochem U.S.A.) at a concentration of 2 mg/ml.

The recovery percentage of the bile acid incubated with the bacterial cultures was calculated by the ratio of the area of the bile acid to be detected (GCA or TCA) to the area of the internal standard. When the quantity of the conjugated bile acid found in the bacterial cultures after 48 hours of incubation was less than 50%, thin layer chromatography (TLC) was performed on silica gel plates to detect the presence of CA and DCA, using a mobile phase of cycloexane/isopropanol/acetic acid (30:10:1 by volume). On every plate, 20  $\mu\text{l}$  of the alcoholic extract of the sample, 20  $\mu\text{l}$  of a solution of CA and DCA, and 20  $\mu\text{l}$  of CA, 20  $\mu\text{l}$  of DCA, were spotted. The plates after development at room temperature, were treated with sulfuric acid and warmed at 145°C until the appearance of the colored spots.

The results of the deconjugation experiments (Table I) show that 5 out of the 17 strains tested with GCA were able to completely deconjugate the bile acid added to the culture, as previously reported in literature and widely known to all researchers. Surprisingly, ten strains were able to deconjugate GCA but not completely, ranging from 9 to 90 percent (Table I). There was no difference among aerobic and anaerobic bacteria. Two strains, Streptococcus thermophilus YS 52 and

Bifidobacterium infantis Bi 6 do not have any deconjugating activity for GCA. The strain YS 52 in addition does not attack the bile acid - taurine bond.

5 Only one out of the 17 strains tested was able to totally deconjugate the TCA: the Bifidobacterium infantis Bi 6.

10 The results of the dehydroxylation experiments (Table II) show that only one (Bi 4) out of the 17 strains is able to completely dehydroxylate GCA. Six strains did not dehydroxylate at all: YS 52; SF 2; SF 4; LA 3; LA 10; Bi 6. The other strains were able to dehydroxylate GCA but not completely, ranging from 9% to 90%. As to 15 TCA, eight strains do not dehydroxylate it at all: YS 52; SF 3; LA 3; LA 10; LB 1; LB 7; LB 77; LS 1. One strain Bi 6 dehydroxylated TCA completely; the other strains dehydroxylated TCA according to varying percentages.

20

25

30

35

Table I

Percentage of deconjugation of GCA and TCA by bacterial cultures after 48 hours of incubation

5

	BACTERIUM	ACCESSION NO.	GCA%	TCA%
	<u>Streptococcus thermophilus</u> YS 46	I-1668	9	9
	<u>Streptococcus thermophilus</u> YS 48	I-1669	17	11
	<u>Streptococcus thermophilus</u> YS 52	I-1670	0	0
10	<u>Streptococcus faecium</u> SF 2	100	3	
	<u>Streptococcus faecium</u> SF 3 I-1671	27	0	
	<u>Streptococcus faecium</u> SF 4	100	12	
	<u>Lactobacillus acidophilus</u> LA 3		100	80
	<u>Lactobacillus acidophilus</u> LA 10		100	95
15	<u>Lactobacillus bulgaricus</u> LB 1	I-1664	9	0
	<u>Lactobacillus bulgaricus</u> LB 3	I-1665	20	12
	<u>Lactobacillus bulgaricus</u> LB 7	I-1666	14	0
	<u>Lactobacillus bulgaricus</u> LB 77	I-1667	20	0
	<u>Lactobacillus casei</u> LS 1 ATCC 25180	21	0	
20	<u>Bifidobacterium infantis</u> Bi 2		80	15
	<u>Bifidobacterium infantis</u> Bi 3		90	10
	<u>Bifidobacterium infantis</u> Bi 4		100	26
	<u>Bifidobacterium infantis</u> Bi 6		0	100

25

30

35

Table II

Percentage of dehydroxylation of GCA and TCA by bacterial cultures after 48 hours of incubation.

5

	BACTERIUM	ACCESSION NO.	GCA%	TCA%
	<u>Streptococcus thermophilus</u> YS 46	I-1668	9	9
	<u>Streptococcus thermophilus</u> YS 48	I-1669	17	11
	<u>Streptococcus thermophilus</u> YS 52	I-1670	0	0
10	<u>Streptococcus faecium</u> SF 2		0	3
	<u>Streptococcus faecium</u> SF 3 I-1671		27	0
	<u>Streptococcus faecium</u> SF 4		0	12
	<u>Lactobacillus acidophilus</u> LA 3		0	0
	<u>Lactobacillus acidophilus</u> LA 10		0	0
15	<u>Lactobacillus bulgaricus</u> LB 1	I-1664	9	0
	<u>Lactobacillus bulgaricus</u> LB 3	I-1665	20	12
	<u>Lactobacillus bulgaricus</u> LB 7	I-1666	14	0
	<u>Lactobacillus bulgaricus</u> LB 77	I-1667	20	0
	<u>Lactobacillus casei</u> LS 1 ATCC 25180	21	0	
20	<u>Bifidobacterium infantis</u> Bi 2		80	15
	<u>Bifidobacterium infantis</u> Bi 3		90	10
	<u>Bifidobacterium infantis</u> Bi 4		100	26
	<u>Bifidobacterium infantis</u> Bi 6		0	100

25 These strains have been deposited with the CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur, under the following accession numbers:

	<u>Streptococcus thermophilus</u> YS 46:	I-1668
	<u>Streptococcus thermophilus</u> YS 48:	I-1669
30	<u>Streptococcus thermophilus</u> YS 52:	I-1670
	<u>Streptococcus faecium</u> SF 3:	I-1671
	<u>Lactobacillus bulgaricus</u> LB 1:	I-1664
	<u>Lactobacillus bulgaricus</u> LB 3:	I-1665
	<u>Lactobacillus bulgaricus</u> LB 7:	I-1666
35	<u>Lactobacillus bulgaricus</u> LB 77:	I-1667

The following strain has been already deposited with the ATCC USA - American Type Culture Collection USA under

the above reproduced accession number:

Lactobacillus casei LS 1: ATCC 25180

The following strains are on the contrary kept at the  
5 Centro Ricerche Sitia-Yomo S.p.A., distinguished by the  
below-reproduced identifiers:

Streptococcus faecium SF 2: SF 2  
Streptococcus faecium SF 4: SF 4  
Lactobacillus acidophilus LA 3: LA 3  
10 Lactobacillus acidophilus LA 10: LA 10  
Bifidobacterium infantis Bi 2: Bi 2  
Bifidobacterium infantis Bi 3: Bi 3  
Bifidobacterium infantis Bi 4: Bi 4  
Bifidobacterium infantis Bi 6: Bi 6

15 These results demonstrate that the majority of the strains tested by us have a low capability to deconjugate the bile acids and that there are strains that do not deconjugate at all. This observation is  
20 surprising in that it has not been known that the bacteria forming the intestinal flora deconjugated the biliary salts. Furthermore, it is evident that the enzymes of the strains are selective for the specific bile acid bound on the side chain. In this study, the  
25 clearest example is offered by the Bifidobacterium infantis Bi 6. This strain is able not to deconjugate the glycine-conjugated bile acid but is able to totally deconjugate the taurine-conjugated bile acid. Some other strains (LS 1, LB 1, LB 7, LB 77, SF 3) are unable  
30 to deconjugate TCA but are able to deconjugate GCA to a certain extent.

To conclude, strains have been discovered that have a weak or zero capability to deconjugate and  
35 dehydroxylate.

Example 2

Three healthy volunteers were tested for their content

of bile acids following treatment with a lactobacilli preparation containing  $1 \times 10^{11}$  cells of Streptococcus thermophilus YS 52 per gram for a daily total of 6 g for 28 days. Before beginning the treatment and after 12 hours starvation, the subjects were intubated and the gallbladder bile, following stimulation with ceruletide, was collected and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The gallbladder contraction was assessed by echography and the position of the tube, in the second portion of the duodenum was checked by Rx (fluoroscopy).

After a 4 week treatment, the subjects underwent a second intubation and collection of bile. The bile samples were then tested for their content of some bile acids as previously described. The results are shown in Table III.

Table III

	Bile Acid		Patient # 1		Patient # 2		Patient # 3	
			before	after	before	after	before	after
20	Glychenodeoxycholic		32	15	22	15	28	12
	Glycodeoxycholic		6	5	9	2	4	3
	Glycoursodeoxycholic		1	5	1	7	1	4
	Taurocholic		9	26	15	25	12	21
	Taurodeoxycholic		1	3	5	8	3	9

25

NOTE: (the bile acids are listed following the hydrophilic capacity order, that is in inverse relation to detergency)

Taurocholic

30 Taurodeoxycholic

Glycoursodeoxycholic

Glycodeoxycholic

Glychenodeoxycholic

35 This experiment is a confirmation of what shown in Example No. 1, that is a lower deconjugation in one of the primary bile acids if bacteria being the object of the present invention are administered. The achieved

result is a longer maintenance of the primary bile acids in the enterohepatic circulation.

The properties of the bile acids are reported in the note to Table III. Thus, according to these results the administration of selected strains of bacteria can reduce the detergency property and therefore the cytolytic activity of bile acids.

10 Example 3

Fourteen patients with chronic hepatitis were treated with a bacterial preparation containing Streptococcus thermophilus YS 46, YS 48 (two strains), Lactobacillus bulgaricus LB1, LB7, LB 77 (three strains) and 15 Lactobacillus casei LS 1. Each strain had been brought to a concentration of  $150 \times 10^9$  cells per gram before being mixed with the others. A mixture of the above mentioned bacteria strains equal to 6 grams per day was administered for 28 days. Liver enzymes were measured 20 before and after the treatment, and the results are shown in Table IV.

25

30

35

Table IV

Influence of the Treatment with the Bacterial Mixture on  
Liver Enzymes Aspartate Transaminase (AST; SGOT) and  
alanine transaminase (ALT; SGPT)

	Patient	AST (SGOT)		ALT (SGPT)	
		before	after	before	after
	# 1	92	59	102	46
10	# 2	89	67	96	42
	# 3	174	86	97	39
	# 4	121	91	102	66
	# 5	116	81	111	55
	# 6	156	87	94	76
15	# 7	163	66	69	37
	# 8	78	64	122	57
	# 9	109	39	87	86
	# 10	166	70	102	48
	# 11	56	24	118	62
20	# 12	131	83	96	79
	# 13	137	86	94	74
	# 14	84	87	144	114
	Mean	119	71	102	63
	Standard deviation	36	19	17	21
25	Significance Student				
	t test for paired data		p<0,001		p<0,001

Obviously, numerous modifications and variations of the present invention are possible in light of the above 30 teachings. It is therefore to be understood that, within the scope of the appended claims, the invention may be practiced otherwise than as specifically described herein.

C L A I M S

1. A strain of bacteria characterized by exhibiting:
  - (a) a  $7\alpha$ -dehydroxylase activity of less than 50%, and
  - (b) a bile acid deconjugation activity of less than 50%, and descendants, mutants and derivatives thereof preserving activities (a) and (b).
2. The bacteria strain of claim 1, selected from the group consisting of Streptococcus thermophilus, Streptococcus faecium, Lactobacillus bulgaricus and Lactobacillus casei.
3. The strain of claim 2, wherein the bacteria strain is Streptococcus thermophilus YS 52 deposited with the CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur, under the accession number I-1670.
4. The strain of claim 2, wherein the bacteria strain is Streptococcus thermophilus YS 46 deposited with the CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur, under the accession number I-1668.
5. The strain of claim 2, wherein the bacteria strain is Streptococcus thermophilus YS 48 deposited with the CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur, under the accession number I-1669.
6. The strain of claim 2, wherein the bacteria strain is Streptococcus faecium SF 3 deposited with the CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur, under the accession number I-1671.
7. The strain of claim 2, wherein the bacteria strain is Lactobacillus bulgaricus LB 1 deposited with the CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur, under the accession number I-1664.

8. The strain of claim 2, wherein the bacteria strain is Lactobacillus bulgaricus LB 3 deposited with the CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur, under the accession number I-1665.

5

9. The strain of claim 2, wherein the bacteria strain is Lactobacillus bulgaricus LB 7 deposited with the CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur, under the accession number I-1666.

10

10. The strain of claim 2, wherein the bacteria strain is Lactobacillus bulgaricus LB 77 deposited with the CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur, under the accession number I-1667.

15

11. The strain of claim 2, wherein the bacteria strain is Lactobacillus casei LS 1 deposited with the ATCC USA - American Type Culture Collection USA, under the accession number ATCC 25180.

20

12. A pharmaceutical composition to be administered enterically, for preventing and/or treating diseases correlated with or caused by an altered metabolism of the bile acids, characterized in that it comprises an effective amount capable of producing a normalizing effect on such an altered metabolism in a patient suffering therefrom, of

25

(1) at least one strain of bacteria provided with:  
30 (a) a 7 $\alpha$ -dehydroxylase activity of less than 50%, and  
(b) a bile acid deconjugation activity of less than 50%, and descendants, mutants and derivatives thereof preserving activities (a) and (b)

(2) a pharmaceutically acceptable carrier.

35

13. The composition of claim 12, wherein said at least one bacteria strain is selected from the group consisting of Streptococcus thermophilus, Streptococcus

faecium, Lactobacillus bulgaricus and Lactobacillus casei.

5 14. The composition of claim 13, wherein the bacteria strain is Streptococcus thermophilus YS 52 deposited with the CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur, under the accession number I-1670.

10 15. The composition of claim 13, wherein the bacteria strain is Streptococcus thermophilus YS 46 deposited with the CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur, under the accession number I-1668.

15

16. The composition of claim 13, wherein the bacteria strain is Streptococcus thermophilus YS 48 deposited with the CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur, under the accession 20 number I-1669.

17. The composition of claim 13, wherein the bacteria strain is Streptococcus faecium SF 3 deposited with the CNCM - Collection Nationale de Cultures de 25 Microorganismes - Institut Pasteur, under the accession number I-1671.

18. The composition of claim 13, wherein the bacteria strain is Lactobacillus bulgaricus LB 1 deposited with the CNCM - Collection Nationale de Cultures de 30 Microorganismes - Institut Pasteur, under the accession number I-1664.

19. The composition of claim 13, wherein the bacteria strain is Lactobacillus bulgaricus LB 3 deposited with the CNCM - Collection Nationale de Cultures de 35 Microorganismes - Institut Pasteur, under the accession number I-1665.

20. The composition of claim 13, wherein the bacteria strain is Lactobacillus bulgaricus LB 7 deposited with the CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur, under the accession number I-1666.
- 5
21. The composition of claim 13, wherein the bacteria strain is Lactobacillus bulgaricus LB 77 deposited with the CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur, under the accession number I-1667.
- 10
22. The composition of claim 13, wherein the bacteria strain is Lactobacillus casei LS 1 deposited with the ATCC USA - American Type Culture Collection USA, under the accession number ATCC 25180.
- 15
23. The composition of any of claims 12-22, comprising 10<sup>5</sup> to 10<sup>12</sup> cells of the bacteria strain per gram of composition.
- 20
24. The composition of any of claims 12-23, further comprising lactulose.
- 25
25. The composition of any of claims 12-23, further comprising bile acid-based preparations, such as ursodeoxycholic acid and taurooursodeoxycholic acid.
26. Use of at least one strain of bacteria characterized by exhibiting:
- 30
- (a) a 7 $\alpha$ -dehydroxylase activity of less than 50%, and  
(b) a bile acid deconjugation activity of less than 50%, and descendants, mutants and derivatives thereof preserving activities (a) and (b), to prepare a pharmaceutical composition for preventing and treating diseases caused by or associated with an altered metabolism of the bile acids.
- 35

27. The use of claim 26, wherein the bacteria strain is selected from the group consisting of Streptococcus thermophilus, Streptococcus faecium, Lactobacillus bulgaricus and Lactobacillus casei.

5

28. The use of claim 27, wherein the bacteria strain is Streptococcus thermophilus YS 52 deposited with the CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur, under the accession number I-1670.

10

29. The use of claim 27, wherein the bacteria strain is Streptococcus thermophilus YS 46 deposited with the CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur, under the accession number I-1668.

15

30. The use of claim 27, wherein the bacteria strain is Streptococcus thermophilus YS 48 deposited with the CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur, under the accession number I-1669.

20

31. The use of claim 27, wherein the bacteria strain is Streptococcus faecium SF 3 deposited with the CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur, under the accession number I-1671.

25

32. The use of claim 27, wherein the bacteria strain is Lactobacillus bulgaricus LB 1 deposited with the CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur, under the accession number I-1664.

30

33. The use of claim 27, wherein the bacteria strain is Lactobacillus bulgaricus LB 3 deposited with the CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Institut Pasteur, under the accession number I-1665.

35

34. The use of claim 27, wherein the bacteria strain is Lactobacillus bulgaricus LB 7 deposited with the CNCM - Collection Nationale de Cultures de Microorganismes -

Institut Pasteur, under the accession number I-1666.

35. The use of claim 27, wherein the bacteria strain is  
Lactobacillus bulgaricus LB 77 deposited with the CNCM -  
5 Collection Nationale de Cultures de Microorganismes -  
Institut Pasteur, under the accession number I-1667.

36. The use of claim 27, wherein the bacteria strain is  
Lactobacillus casei LS 1 deposited with the ATCC USA -  
10 American Type Culture Collection USA, under the  
accession number ATCC 25180.

15

20

25

30

35

# COPIE POUR INFORMATION

# CNCM

Paris, le 29 février 1996

Collection Nationale  
de Cultures de Microorganismes

INSTITUT PASTEUR  
25, Rue du Docteur Roux  
75724 PARIS CEDEX 15

Tél : (33-1) 45 68 82 50  
Fax : (33-1) 45 68 82 36

à SITIA-YOMO S.P.A.

Via Quaranta 42  
20139 MILANO  
ITALY

A l'attention de Mme R. CAVALIERE VESELY

Objet : Dépôt des microorganismes :

"LB1", "LB3", "LB7", "LB77", "YS46", "YS48", "YS52", "SF3".

enregistrés à la CNCM sous les numéros :

I - 1664, I - 1665, I - 1666, I - 1667, I - 1668, I - 1669, I - 1670 et I - 1671.

à la date du 08 FEVRIER 1996.

Nos réf. : CNCM - YC - 5010.602

Copie : Monsieur Tomaso SOZZI, SITIA-YOMO S.P.A., Centro Ricerche, Strada per Merlino 3,  
20060 ZELO BUON PERSICO (MI)

P.J. : Récépissés de dépôt,  
Déclarations sur la viabilité

Madame,

Afin de confirmer l'acceptation des microorganismes identifiés ci-dessus, reçus en vue d'un dépôt aux termes du Traité de Budapest, je vous adresse ci-joint les récépissés visés à la règle 7.

Vous trouverez également ci-inclus les premières déclarations sur la viabilité établies conformément à la règle 10.

Vous souhaitant bonne réception de la présente et restant à votre disposition, veuillez agréer, Madame, l'expression de ma considération distinguée.

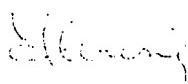
  
Mme Y. CERISIER  
DIRECTEUR ADMINISTRATIF DE LA CNCM

Exhibit A

Paris, le 21 mai 1996

# CNCM

Collection Nationale  
de Cultures de Microorganismes

## INSTITUT PASTEUR

25, Rue du Docteur Roux  
75724 PARIS CEDEX 15

Tel : (33-1) 45 68 82 50

Fax : (33-1) 45 68 82 36

## SITIA-YOMO S.P.A.

Centro Ricerche,  
Strada per Merlino 3  
20060 ZELO BUON PERSICO (MI)  
ITALIE

A l'attention de **Monsieur Tomaso SOZZI**

Obj : ACCORDS DE CONFORMITE  
N/r : CNCM - YC - 5094.605  
Copie : Madame Renata CAVALIERE VESELY, SITIA-YOMO S.P.A.,  
Via Quaranta 42 - 20139 MILANO - ITALIE

Les microorganismes désignés ci-après ont été déposés auprès de la CNCM aux termes du Traité de Budapest au nom de :

SITIA-YOMO S.P.A.  
VIA QUARANTA 42  
20139 MILANO  
ITALY

par vos soins en tant que responsable scientifique à la date du 08 FEVRIER 1996

### Références d'identification

LB1  
LB3  
LB7  
LB77  
YS46  
YS48  
YS52  
SF3

### Numéros d'ordre attribués par la CNCM

I - 1664✓  
I - 1665✓  
I - 1666✓  
I - 1667✓  
I - 1668✓  
I - 1669✓  
I - 1670✓  
I - 1671✓

O Klo-G-96  
J 022

Nous vous prions de bien vouloir nous renvoyer, après examen, les formules ci-jointes, dûment remplies et signées.

Chacun des lots mentionnés, préparés par la CNCM, est destiné à répondre pendant 35 ans aux requêtes en remise d'échantillons conformément à la réglementation applicable.

En cas de non-réponse à une demande de contrôle de conformité dans le délai de trois mois après réception des échantillons, les propriétés de la subculture en question sont considérées identiques aux propriétés de la subculture ayant fait l'objet du dépôt initial.

*Y. Cerisier*

Mme Y. CERISIER  
DIRECTEUR ADMINISTRATIF DE LA CNCM

*Exhibit B*

TRAITE DE BUDAPEST SUR LA RECONNAISSANCE  
INTERNATIONALE DU DEPOT DES MICRO-ORGANISMES  
AUX FINS DE LA PROCEDURE EN MATIERE DE BREVETS

FORMULE INTERNATIONALE

DESTINATAIRE :

SITIA-YOMO S.P.A.  
VIA QUARANTA 42  
20139 MILANO  
ITALY

RECEPISSE EN CAS DE DEPOT INITIAL,  
délivré en vertu de la règle 7.1 par  
L'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE  
identifiée au bas de cette page

NOM ET ADRESSE  
DU DEPOSANT

<b>I. IDENTIFICATION DU MICRO-ORGANISME</b>	
Référence d'identification donnée par le DEPOSANT :	Numéro d'ordre attribué par l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE :
YS52	I - 1670
<b>II. DESCRIPTION SCIENTIFIQUE ET/OU DESIGNATION TAXONOMIQUE PROPOSEE</b>	
Le micro-organisme identifié sous chiffre I était accompagné :	
<input checked="" type="checkbox"/> d'une description scientifique	
<input checked="" type="checkbox"/> d'une désignation taxonomique proposée	
(Cocher ce qui convient)	
<b>III. RECEPTION ET ACCEPTATION</b>	
La présente autorité de dépôt internationale accepte le micro-organisme identifié sous chiffre I, qu'elle a reçu le 08 FEVRIER 1996 (date du dépôt initial) <sup>1</sup>	
<b>IV. RECEPTION D'UNE REQUETE EN CONVERSION</b>	
La présente autorité de dépôt internationale a reçu le micro-organisme identifié sous chiffre I le _____ (date du dépôt initial) et a reçu une requête en conversion du dépôt initial en dépôt conforme au Traité de Budapest le _____ (date de réception de la requête en conversion)	
<b>V. AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE</b>	
Nom : <b>CNCM</b> Collection Nationale de Cultures de Microorganismes	Signature(s) de la (des) personne(s) compétente(s) pour représenter l'autorité de dépôt internationale ou de l'(des) employé(s) autorisé(s) : Mme Y. CERISIER <small>Directeur Administratif de la CNCM</small>
Adresse : <b>INSTITUT PASTEUR</b> 28, Rue du Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15	 Date : Paris, le 29 février 1996

<sup>1</sup> En cas d'application de la règle 6.4.d), cette date est la date à laquelle le statut d'autorité de dépôt internationale a été acquis.

INFORMATION RUE PECHEUR

TRAITE DE BUDAPEST SUR LA RECONNAISSANCE  
INTERNATIONALE DU DEPOT DES MICRO-ORGANISMES  
AUX FINS DE LA PROCEDURE EN MATIERE DE BREVETS

FORMULE INTERNATIONALE

DESTINATAIRE : RECEPISSE EN CAS DE DEPOT INITIAL,  
SITIA-YOMO S.P.A. délivré en vertu de la règle 7.1 par  
VIA QUARANTA 42 l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE  
20139 MILANO identifiée au bas de cette page  
ITALY

NOM ET ADRESSE  
DU DEPOSANT

I. IDENTIFICATION DU MICRO-ORGANISME

Référence d'identification donnée par le  
DEPOSANT : Numéro d'ordre attribué par  
l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE :

YS46

I - 1668

II. DESCRIPTION SCIENTIFIQUE ET/OU DESIGNATION TAXONOMIQUE PROPOSEE

Le micro-organisme identifié sous chiffre I était accompagné :



d'une description scientifique



d'une désignation taxonomique proposée

(Cocher ce qui convient)

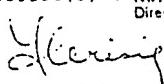
III. RECEPTION ET ACCEPTATION

La présente autorité de dépôt internationale accepte le micro-organisme identifié sous  
chiffre I, qu'elle a reçu le 08 FEVRIER 1996 (date du dépôt initial)<sup>1</sup>

IV. RECEPTION D'UNE REQUETE EN CONVERSION

La présente autorité de dépôt internationale a reçu le micro-organisme identifié sous  
chiffre I le \_\_\_\_\_ (date du dépôt initial)  
et a reçu une requête en conversion du dépôt initial en dépôt conforme au Traité de  
Budapest le \_\_\_\_\_ (date de réception de la requête en conversion)

V. AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE

Nom :	CNCM Collection Nationale de Cultures de Microorganismes	Signature(s) de la (des) personne(s) compétente(s) pour représenter l'autorité de dépôt internationale ou de l'(des) employé(s) autorisé(s) : Mme Y. CERISIER Directeur Administratif de la CNCM
Adresse :	INSTITUT PASTEUR 28, Rue du Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15	 Date : Paris, le 29 février 1996

<sup>1</sup> En cas d'application de la règle 6.4.d), cette date est la date à laquelle le statut  
d'autorité de dépôt internationale a été acquis.

CONFIDENTIAL INFORMATION

TRAITE DE BUDAPEST SUR LA RECONNAISSANCE  
INTERNATIONALE DU DEPOT DES MICRO-ORGANISMES  
AUX FINS DE LA PROCEDURE EN MATIERE DE BREVETS

FORMULE INTERNATIONALE

**DESTINATAIRE :**

SITIA-YOMO S.P.A.  
VIA QUARANTA 42  
20139 MILANO  
ITALY

RECEPISSE EN CAS DE DEPOT INITIAL,  
délivré en vertu de la règle 7.1 par  
l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE  
identifiée au bas de cette page

**NOM ET ADRESSE  
DU DEPOSANT**

**I. IDENTIFICATION DU MICRO-ORGANISME**

Référence d'identification donnée par le  
DEPOSANT :

YS48

Numéro d'ordre attribué par  
l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE :

I - 1669

**II. DESCRIPTION SCIENTIFIQUE ET/OU DESIGNATION TAXONOMIQUE PROPOSEE**

Le micro-organisme identifié sous chiffre I était accompagné :



d'une description scientifique



d'une désignation taxonomique proposée

(Cocher ce qui convient)

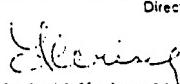
**III. RECEPTION ET ACCEPTATION**

La présente autorité de dépôt internationale accepte le micro-organisme identifié sous  
chiffre I, qu'elle a reçu le 08 FEVRIER 1996 (date du dépôt initial)<sup>1</sup>

**IV. RECEPTION D'UNE REQUETE EN CONVERSION**

La présente autorité de dépôt internationale a reçu le micro-organisme identifié sous  
chiffre I le \_\_\_\_\_ (date du dépôt initial)  
et a reçu une requête en conversion du dépôt initial en dépôt conforme au Traité de  
Budapest le \_\_\_\_\_ (date de réception de la requête en conversion)

**V. AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE**

<p>Nom : <b>CNCM</b> Collection Nationale de Cultures de Microorganismes</p> <p>Adresse : <b>INSTITUT PASTEUR</b> 28, Rue du Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15</p>	<p>Signature(s) de la (des) personne(s) compétente(s) pour représenter l'autorité de dépôt internationale ou de l'(des) employé(s) autorisé(s) : Mme Y. CERISIER Directeur Administratif de la CNCM</p> <p></p> <p>Date : Paris, le 29 février 1996</p>
--	---

<sup>1</sup> En cas d'application de la règle 6.4.d), cette date est la date à laquelle le statut d'autorité de dépôt internationale a été acquis.

PRINCIPAL INFORMATION

TRAITE DE BUDAPEST SUR LA RECONNAISSANCE  
INTERNATIONALE DU DEPOT DES MICRO-ORGANISMES  
AUX FINS DE LA PROCEDURE EN MATIERE DE BREVETS

FORMULE INTERNATIONALE

DESTINATAIRE :

SITIA-YOMO S.P.A.  
VIA QUARANTA 42  
20139 MILANO  
ITALY

RECEPISSE EN CAS DE DEPOT INITIAL,  
délivré en vertu de la règle 7.1 par  
l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE  
identifiée au bas de cette page

NOM ET ADRESSE  
DU DEPOSANT

<b>I. IDENTIFICATION DU MICRO-ORGANISME</b>	
Référence d'identification donnée par le DEPOSANT :	Numéro d'ordre attribué par l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE :
LB1	I - 1664
<b>II. DESCRIPTION SCIENTIFIQUE ET/OU DESIGNATION TAXONOMIQUE PROPOSEE</b>	
Le micro-organisme identifié sous chiffre I était accompagné :	
<input checked="" type="checkbox"/> d'une description scientifique <input checked="" type="checkbox"/> d'une désignation taxonomique proposée  <small>(Cocher ce qui convient)</small>	
<b>III. RECEPTION ET ACCEPTATION</b>	
La présente autorité de dépôt internationale accepte le micro-organisme identifié sous chiffre I, qu'elle a reçu le 08 FEVRIER 1996 (date du dépôt initial) <sup>1</sup>	
<b>IV. RECEPTION D'UNE REQUETE EN CONVERSION</b>	
La présente autorité de dépôt internationale a reçu le micro-organisme identifié sous chiffre I le _____ (date du dépôt initial) et a reçu une requête en conversion du dépôt initial en dépôt conforme au Traité de Budapest le _____ (date de réception de la requête en conversion)	
<b>V. AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE</b>	
Nom :	Signature(s) de la (des) personne(s) compétente(s) pour représenter l'autorité de dépôt internationale ou de l'(des) employé(s) autorisé(s) : Mme Y. CERISIER Directeur Administratif de la CNCM
Adresse :	INSTITUT PASTEUR 28, Rue du Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15
Date : Paris, le 29 février 1996	

<sup>1</sup> En cas d'application de la règle 6.4.d), cette date est la date à laquelle le statut d'autorité de dépôt internationale a été acquis.

DEPOT INTERNATIONALE

TRAITE DE BUDAPEST SUR LA RECONNAISSANCE  
INTERNATIONALE DU DEPOT DES MICRO-ORGANISMES  
AUX PINS DE LA PROCEDURE EN MATIERE DE BREVETS

FORMULE INTERNATIONALE

DESTINATAIRE :

SITIA-YOMO S.P.A.  
VIA QUARANTA 42  
20139 MILANO  
ITALY

RECEPISSE EN CAS DE DEPOT INITIAL,  
délivré en vertu de la règle 7.1 par  
l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE  
identifiée au bas de cette page

NOM ET ADRESSE  
DU DEPOSANT

I. IDENTIFICATION DU MICRO-ORGANISME

Référence d'identification donnée par le  
DEPOSANT :

LB3

Numéro d'ordre attribué par  
l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE :

I - 1665

II. DESCRIPTION SCIENTIFIQUE ET/OU DESIGNATION TAXONOMIQUE PROPOSEE

Le micro-organisme identifié sous chiffre I était accompagné :



d'une description scientifique



d'une désignation taxonomique proposée

(Cocher ce qui convient)

III. RECEPTION ET ACCEPTATION

La présente autorité de dépôt internationale accepte le micro-organisme identifié sous  
chiffre I, qu'elle a reçu le 08 FEVRIER 1996 (date du dépôt initial)<sup>1</sup>

IV. RECEPTION D'UNE REQUETE EN CONVERSION

La présente autorité de dépôt internationale a reçu le micro-organisme identifié sous  
chiffre I le \_\_\_\_\_ (date du dépôt initial)  
et a reçu une requête en conversion du dépôt initial en dépôt conforme au Traité de  
Budapest le \_\_\_\_\_ (date de réception de la requête en conversion)

V. AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE

Nom :

CNCM

Collection Nationale  
de Cultures de Microorganismes

Signature(s) de la (des) personne(s)  
compétente(s) pour représenter l'autorité  
de dépôt internationale ou de l'(des)  
employé(s) autorisé(s) : Mme Y. CERISIER  
Directeur Administratif de la CNCM

Adresse :

INSTITUT PASTEUR  
28, Rue du Docteur Roux  
F-75724 PARIS CEDEX 15

Date : Paris, le 29 février 1996

<sup>1</sup> En cas d'application de la règle 6.4.d), cette date est la date à laquelle le statut  
d'autorité de dépôt internationale a été acquis.

DÉPÔT D'INFORMATION

TRAITE DE BUDAPEST SUR LA RECONNAISSANCE  
INTERNATIONALE DU DEPOT DES MICRO-ORGANISMES  
AUX FINS DE LA PROCEDURE EN MATIERE DE BREVETS

FORMULE INTERNATIONALE

DESTINATAIRE :

SITIA-YOMO S.P.A.  
VIA QUARANTA 42  
20139 MILANO  
ITALY

RECEPISSE EN CAS DE DEPOT INITIAL,  
délivré en vertu de la règle 7.1 par  
l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE  
identifiée au bas de cette page

NOM ET ADRESSE  
DU DEPOSANT

I. IDENTIFICATION DU MICRO-ORGANISME

Référence d'identification donnée par le  
DEPOSANT :

LB7

Numéro d'ordre attribué par  
l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE :

I - 1666

II. DESCRIPTION SCIENTIFIQUE ET/OU DESIGNATION TAXONOMIQUE PROPOSEE

Le micro-organisme identifié sous chiffre I était accompagné :



d'une description scientifique



d'une désignation taxonomique proposée

(Cocher ce qui convient)

III. RECEPTION ET ACCEPTATION

La présente autorité de dépôt internationale accepte le micro-organisme identifié sous  
chiffre I, qu'elle a reçu le 08 FEVRIER 1996 (date du dépôt initial)<sup>1</sup>

IV. RECEPTION D'UNE REQUETE EN CONVERSION

La présente autorité de dépôt internationale a reçu le micro-organisme identifié sous  
chiffre I le \_\_\_\_\_ (date du dépôt initial)  
et a reçu une requête en conversion du dépôt initial en dépôt conforme au Traité de  
Budapest le \_\_\_\_\_ (date de réception de la requête en conversion)

V. AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE

Nom :

CNCM

Collection Nationale  
de Cultures de Microorganismes

Adresse :

INSTITUT PASTEUR

28, Rue du Docteur Roux  
F-75724 PARIS CEDEX 15

Signature(s) de la (des) personne(s)  
compétente(s) pour représenter l'autorité  
de dépôt internationale ou de l'(des)  
employé(s) autorisé(s) : Mme Y. CERISIER  
Directeur Administratif de la CNCM

Date : Paris, le 29 février 1996

<sup>1</sup> En cas d'application de la règle 6.4.d), cette date est la date à laquelle le statut  
d'autorité de dépôt internationale a été acquis.

PRINCIPAL INFORMATION

TRAITE DE BUDAPEST SUR LA RECONNAISSANCE  
INTERNATIONALE DU DEPOT DES MICRO-ORGANISMES  
AUX FINS DE LA PROCEDURE EN MATIERE DE BREVETS

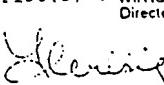
FORMULE INTERNATIONALE

**DESTINATAIRE :**

SITIA-YOMO S.P.A.  
VIA QUARANTA 42  
20139 MILANO  
ITALY

RECEPISSE EN CAS DE DEPOT INITIAL,  
délivré en vertu de la règle 7.1 par  
l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE  
identifiée au bas de cette page

**NOM ET ADRESSE  
DU DEPOSANT**

<b>I. IDENTIFICATION DU MICRO-ORGANISME</b>	
Référence d'identification donnée par le DEPOSANT :	Numéro d'ordre attribué par l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE :
LB77	I - 1667
<b>II. DESCRIPTION SCIENTIFIQUE ET/OU DESIGNATION TAXONOMIQUE PROPOSEE</b>	
<p>Le micro-organisme identifié sous chiffre I était accompagné :</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> d'une description scientifique</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> d'une désignation taxonomique proposée</p> <p>(Cocher ce qui convient)</p>	
<b>III. RECEPTION ET ACCEPTATION</b>	
<p>La présente autorité de dépôt internationale accepte le micro-organisme identifié sous chiffre I, qu'elle a reçu le 08 FEVRIER 1996 (date du dépôt initial)<sup>1</sup></p>	
<b>IV. RECEPTION D'UNE REQUETE EN CONVERSION</b>	
<p>La présente autorité de dépôt internationale a reçu le micro-organisme identifié sous chiffre I le _____ (date du dépôt initial) et a reçu une requête en conversion du dépôt initial en dépôt conforme au Traité de Budapest le _____ (date de réception de la requête en conversion)</p>	
<b>V. AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE</b>	
Nom :	Signature(s) de la (des) personne(s) compétente(s) pour représenter l'autorité de dépôt internationale ou de l'(des) employé(s) autorisé(s) : Mme Y. CERISIER Directeur Administratif de la CNCM
CNCM Collection Nationale de Cultures de Microorganismes	 Date : Paris, le 29 février 1996
Adresse :	INSTITUT PASTEUR 28, Rue du Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15

<sup>1</sup> En cas d'application de la règle 6.4.d), cette date est la date à laquelle le statut d'autorité de dépôt internationale a été acquis.

REQUETE EN CONVERSION